

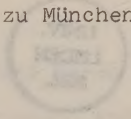
**UNTERSUCHUNGEN ÜBER
OMMOCHROMGRANULA UND ZUR BIOSYNTHESE
DER OMMOCHROME**

Hans Eberhard Hehl

1974

UNTERSUCHUNGEN ÜBER OMMOCHROMGRANULA
UND ZUR BIOSYNTHESE DER OMMOCHROME

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Biologie
der Ludwig - Maximilians - Universität
zu München



vorgelegt von
Hans Eberhard Hehl
aus Traunstein

März 1974



1. Berichterstatter: Prof. Dr. B. Linzen
2. Berichterstatter: Prof. Dr. H.J. Becker
Tag der mündlichen Prüfung: 21. Juni 1974

Die vorliegende Arbeit wurde am Zoologischen Institut der Universität München unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Bernt Linzen durchgeführt, und von der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert.

Mein Dank gilt besonders Herrn Prof. Dr. Bernt Linzen, der durch stetes Interesse, andauernde Hilfsbereitschaft und wertvolle Anregungen viel zur Durchführung dieser Arbeit beigetragen hat.

Weiter danke ich Frl. H. Tscharncke und Frl. D. Oesterle für die Einweisung am Elektronenmikroskop, Frl. M. Holland für die Hilfe bei der Fliegenzucht.

Herzlicher Dank gilt meiner Frau, die mir bei der Fertigstellung des Manuskriptes geholfen hat.

INHALTSANGABE

A) EINLEITUNG	Seite 1
B) MATERIAL UND METHODEN	4
Tiermaterial	4
Chemikalien	5
1) Allgemeine Chemikalien	5
2) Darstellung und Reinigung von Dihydro-xanthommatin	6
3) Darstellung und Reinigung von 3-Hydroxy-L-kynurenin-(^3H). Identifizierung des 3-Hydroxy-kynurenin-methylesters	7
Applikation radioaktiver Vorstufen	8
Aufarbeitung radioaktiv markierter Tiere	9
Isolierung der Pigmentgranula	10
1) Vorbereitung der Proben	10
2) Aufbau des Gradienten. Isolierung der Banden	11
Quantitative Bestimmungen	13
1) Farbstoff	13
2) Stickstoff	13
3) Succindehydrogenase	14
Chromatographische Methoden	14
1) Papierchromatographie	14
2) Dünnschichtchromatographie von Hydrolysaten	15
3) Säulenchromatographie	15
4) Disk-Elektrophorese in Polyacrylamidgel	16

Isotopenmessungen	Seite 17
Elektronenmikroskopie	18
1) Vorbereitung der Präparate	18
2) Fixierung	18
3) Entwässerung, Stückkontrastierung und Einbettung	19
4) Anfertigung der Schnitte und Aufnahmen	19
C) ERGEBNISSE UND DISKUSSION	20
I. Versuche zur Isolierung und Anreicherung von Ommochromgranula	20
1) Vorversuche zur Isolierung von Ommochromgranula	20
2) Versuche zur quantitativen Bestimmung der Anreicherung	24
3) Elektronenmikroskopische Beurteilung der Anreicherung von Granula	31
II. Elektronenmikroskopische Untersuchung isolierter Granula	36
1) Vergleich verschiedener Fixierungs- und Kontrastierungsmethoden	36
2) Granula von Calliphora, Gryllus und Locusta im Vergleich	39
a) Feinstruktur	39
b) Größe und Dichte der Granula	44
3) Feinstrukturen der Granula in situ	47
4) Vergleich der Granula aus Augen von Wildform und Mutante white (Männchen) bei Calliphora erythrocephala	50
5) Spektren von angereicherten Granula	51
6) Vorversuche zum Nachweis eines Ommochrom-Proteids	57

III. Versuche zur Ommochrombiosynthese	Seite 60
1) Xanthommatinbiosynthese in der Entwicklung von <i>Calliphora erythrocephala</i> M.	60
a) Reinigung kleiner Mengen (^{14}C)- markierten Xanthommatins	61
b) Der Einbau von Tryptophan-(^{14}C) in Xanthommatin während und nach der Imaginalentwicklung von <i>Calliphora</i> <i>erythrocephala</i>	65
c) Versuche zur Frage des Turnovers von Augenpigment	67
d) Diskussion	72
2) Versuche zur Ommochrombiosynthese in vitro	75
 D) ZUSAMMENFASSUNG	 82
 E) LITERATUR	 85

Anhang: 11 Photoseiten

A) E I N L E I T U N G

Der Sammelbegriff Ommochrome erschien zum ersten Mal 1942 in der posthum gedruckten Habilitationsschrift von ERICH BECKER. Er bezeichnete damit einen neuen Pigmenttypus und unterschied diesen von den bereits bekannten Klassen tierischer Farbstoffe, den Melaninen, Chinonfarbstoffen, Porphyrinfarbstoffen, Carotinoiden und Pterinen.

BECKER beschrieb innerhalb der Ommochrome zwei Untergruppen, die Ommatine und Ommine. Nach der Strukturaufklärung dreier Ommatine durch den Arbeitskreis um BUTENANDT führte LINZEN (1967) eine neue Einteilung der Ommochrome aufgrund struktureller Kriterien durch und teilte diese Farbstoffe in vier Gruppen ein:

Die erste Gruppe, die Ommatine, ist am besten untersucht (Zusammenfassung bei BUTENANDT, 1960). Zu dieser Gruppe gehören die Farbstoffe, die als chromophores System das 3,4-Pyridino-phenoxazon enthalten, wie das Xanthommatin und seine Derivate Rhodommatin und Ommatin D. Zur zweiten Gruppe gehören die Ommine. Diese Farbstoffe zerfallen bei saurer Hydrolyse in 3-Hydroxy-kynurenin und den sogenannten "Farbstoff IV". Die dritte Gruppe bilden die Ommidine, die 1966 von LINZEN charakterisiert wurden. Zur vierten, noch ziemlich unbekannten Gruppe gehören labile Epidermispigmente, die bei Orthopteren und Odonaten auftreten.

Durch die Zusammenarbeit der Arbeitskreise um BUTENANDT und KÜHN wurden die biosynthetischen Vorstufen der Ommochrome als Tryptophan, Kynurenin und 3-Hydroxy-kynurenin identifiziert. Die Ommine (BUTENANDT et al., 1958) und Ommidine (LINZEN, 1966) enthalten auch Schwefel, der aus dem Methionin-Stoffwechsel stammt (LINZEN, 1970). Die Bindungsart des Schwefels ist noch unbekannt, ebenso fehlt eine Strukturaufklärung dieser schwefelhaltigen Ommochrome. Ommatin D enthält zwar ebenfalls Schwefel, dieser liegt jedoch als Schwefelsäureester vor.

Der letzte Stoffwechselschritt vom 3-Hydroxy-kynurenin sowie von den schwefelhaltigen Vorstufen zu den Ommochromen ist an spezifische Trägergranula gebunden (KÜHN, 1941; HANSER, 1948; ZIEGLER und JAENICKE, 1959; SHOUP, 1966; FUGE, 1967). Aus den bisherigen Kenntnissen über die Biosynthese der Ommochrome sind diese Granula vermutlich eine Art "Endstation" für Stoffwechselprodukte, deren wahllose Anhäufung für den Organismus schädlich wäre (LINZEN, 1967). Über die Art der Bindung des Farbstoffes an die Trägergranula ist nichts bekannt. Fehlen diese Trägergranula, wie z.B. bei der Mutante wa von *Epehestia* (HANSER, 1946) oder sind sie durch Mutation verändert wie bei der Mutante chalky von *Calliphora* (LANGER, 1967), so werden Ommochrome nicht gebildet. Die Analyse der Endsynthese der Ommochrome wird daher von diesen Granula ausgehen müssen. ZIEGLER und JAENICKE (1959) bestimmten eine Anzahl mitochondrialer

Enzymaktivitäten an "isolierten" Pigmentgranula von *Drosophila*. Diese Granulapräparationen waren jedoch nur zu 50 Proz. rein (SCHWABL, unveröffentlicht). Sie enthielten Mitochondrien und andere Zellbestandteile. Für biochemische Arbeiten mit Ommochromgranula sind aber Präparationen erforderlich, die keine anderen Bestandteile mehr enthalten. Diese könnten Stoffwechselaktivitäten vortäuschen, die gar nicht vorhanden sind. Der erste Abschnitt der vorliegenden Arbeit befaßt sich mit den Methoden zur Isolierung von Pigmentgranula aus verschiedenen Ausgangsmaterialien. Da Vorarbeiten auf diesem Gebiet spärlich sind, mußten möglichst viele Parameter berücksichtigt werden.

Obwohl seit Entdeckung der Ommochrome immer vermutet wurde, daß Ommochrome an Proteine gebunden seien, sind früher nur wenige Versuche zur Isolation eines solchen Chromoproteins durchgeführt worden (BOWNESS und WOLKEN, 1959; YOSHIDA et al., 1967). In letzter Zeit beschrieben ISHIGURO und NAGAMURA (1971) und AJAMI und RIDDIFORD (1971) Ommochrom-Proteide. Für die Isolierung solcher Proteide sind als Ausgangsmaterial ebenfalls Granulapräparationen ohne Fremdproteine vorzuziehen. In dieser Arbeit werden einige Vorversuche zur Isolierung von Chromoproteinen durchgeführt.

Als Fernziel sollten Versuche zur Biosynthese von Ommochromen mit Granula durchgeführt werden. Eine Voraussetzung dafür sind auch reine Granulapräparationen. Eine zweite Voraussetzung aber ist die Kenntnis, zu welchem Zeitpunkt

der Imaginalentwicklung eine Synthese von Ommochromen erfolgt. Die Zunahme des Xanthommatins in der Imaginalentwicklung von *Calliphora* war durch die Versuche von LINZEN (1963) bekannt. Ungeklärt ist aber die Frage, ob diese Zunahme ein Ausdruck der Syntheserate ist. Ommochrome werden allgemein als Stoffwechselendprodukte angesehen. Versuche, die das beweisen, fehlen jedoch bisher, und bei der Vielzahl von Rollen, welche die Ommochrome bei Insekten spielen, scheint es nicht ausgeschlossen, daß sie einem Turnover unterworfen sind. Versuche zu diesen Fragen sind im zweiten Teil der Arbeit beschrieben. Dazu wurden radioaktives Tryptophan und 3-Hydroxykynurenin während und nach der Imaginalentwicklung von *Calliphora* in Xanthommatin eingebaut.

B) MATERIAL UND METHODEN

Tiermaterial

1) *Calliphora erythrocephala* M.

Wildform und Mutante "white" wurden als Inzuchtstamm auf Pferdefleisch in Massen gezogen. Die Larven wurden in Ansätzen von ca. 200 Tieren pro 1 l-Weckglas mit ca. 250 g Fleisch bei 20°C im Brutschrank gehalten. Die Imagines wurden ohne Temperatur- oder Feuchtigkeitskonstanz gehalten. Sie erhielten Hefe, Zucker und Wasser. Für die Ein-

bauversuche wurden Puppen gleichen Färbungsgrades (gelbbraun) bzw. Imagines mit gleichem Schlupfdatum ($\pm$ 1 Stunde) ausgelesen und unter konstanten Bedingungen weiter gehalten.

2) Locusta migratoria L. und Gryllus bimaculatus DE GEER

Die Wanderheuschrecken stammen aus Institutszuchten, die seit Jahren unter Inzuchtbedingungen nach den Angaben von HUNTER-JONES (1961) gehalten werden. Zusätzlich wurden Wanderheuschrecken aus der Zucht des Institutes für Physiologische Chemie⁺ verwendet. Es wurden jeweils adulte Tiere beiderlei Geschlechtes genommen. Die Angaben zur Grillenzucht finden sich bei FUZEAU-BRAESCH (1960).

Chemikalien

1) Allgemeine Chemikalien

Alle Chemikalien waren nach Möglichkeit von p.a. Qualität. Die Lösungsmittel Aceton, Methanol und Phenäthylamin wurden redestilliert.

"Urovist zur Infusion" wurde von der Schering AG, München, die Eichproteine von Boehringer, Mannheim bezogen. Die Detergentien Cetyltrimethylammoniumbromid und 2,5 Dimethyl-oenzolsulfonsäure wurden von Serva, Heidelberg, die Kompo-

⁺Herrn Dr. Kleinow sei an dieser Stelle gedankt.

nenten des Einbettungsmittels "Durcupan" für die Elektronenmikroskopie von der Fluka AG, Buchs geliefert. D,L-Tryptophan (Benzolring-U-¹⁴C, 52 mC/mM) stammte von Radiochemical Centre, Amersham, "Omnifluor" von NEN-Chemicals GmbH, Dreieichenhain. 3-Hydroxy-D,L-kynurenin war von Herrn Dr. P. Traub synthetisiert worden, 3-Hydroxy-L-kynurenin war ein Geschenk der Firma Senju, Japan.

2) Darstellung und Reinigung von Dihydroxanthommatin

Dihydroxanthommatin wurde in Anlehnung an BUTENANDT et al. (1954) durch Oxydation von 3-Hydroxy-D,L-kynurenin mit Kaliumhexacyanoferrat dargestellt. 50 mg (0,22 mM) 3-Hydroxy-D,L-kynurenin und 700 mg (2,13 mM) Kaliumhexacyanoferrat wurden in je 4 ml 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,0 unter Erwärmen gelöst und die Lösungen vereinigt. Nach 20 Min. bei Raumtemperatur wurden 300 mg Ascorbinsäure zugegeben und das Dihydroxanthommatin mit wenigen Tropfen 0,01 N HCl ausgefällt und abzentrifugiert. In den rot gefärbten Überstand wurde SO₂ eingeleitet, mit Wasser 1:2 verdünnt und abzentrifugiert. Beide Farbstoffniederschläge wurden in je 5 ml 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,0 gelöst und durch ein gehärtetes Filterpapier gesaugt. Der Farbstoff wurde durch siebenmaliges Umfällen gereinigt, mit verdünnter schwefliger Säure, verdünnter Ameisensäure und Aceton gewaschen und über P₂O₅ bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Die Ausbeute betrug 10 mg, der molare Extinktionskoeffizient $\epsilon_{440 \text{ nm}}$ in 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,0 betrug 10764 (cm² x mM⁻¹) (Lit.: 13200 (BUTENANDT et al., 1960)).

3) Darstellung und Reinigung von 3-Hydroxy-L-kynurenin-(^3H)

In Anlehnung an GRÜGER et al. (1961) wurde 3-Hydroxy-L-kynurenin mit Tritiumwasser und HCl am aromatischen Kern markiert. 100 mg (0,446 mM) 3-Hydroxy-L-kynurenin, in 1 ml 1 N HCl gelöst und 0,2 ml (ca. 0,7 Curie) HTO wurden in einem Schenkel eines Doppelschlenkrohres eingefroren und abwechselnd evakuiert und mit Stickstoff gespült. Die säurekatalysierte Tritiierung erfolgte 16 Std. bei 90°C. Das HTO wurde anschließend in den zweiten Schenkel (gekühlt mit Methanol/Trockeneis) überdestilliert und abpipettiert. Das labil gebundene Tritium wurde mit Methanol, in einem zweiten Versuch mit Wasser abgetauscht, bis die jeweils abgespaltene Aktivität sehr gering wurde und konstant blieb. Die tritierte Substanz wurde in 3 ml Wasser gelöst und über eine Säule (1,5 x 125 cm) von Sephadex G 25 mit Wasser chromatographiert. Die gelb getönten fluoreszierenden Fraktionen wurden papierchromatographisch in BEW untersucht. Aus Fraktionen, die neben 3-Hydroxy-L-kynurenin eine zweite fluoreszierende Substanz enthielten, wurde das 3-Hydroxy-L-kynurenin präparativ in BEW abgetrennt. Die vereinigten Eluate wurden in der Kühle belassen und die gelbliche, in Nadeln auskristallisierte Substanz über P_2O_5 getrocknet. Die Ausbeute betrug 9,8 mg an kristallisiertem 3-Hydroxy-L-kynurenin-(^3H). Die spezifische Aktivität wurde zu 15,4 mC/mM bestimmt.

Zur Identifizierung des 3-Hydroxy-L-kynurenin-methylesters

wurden 2 ml des Esters mit 5 ml 2,5 N HCl in einem geschlossenen Kölbchen 30 Min. bei 90°C im Wasserbad erwärmt und das Hydrolysat papierchromatographisch in BEW aufgetrennt.

5 mg 3-Hydroxy-L-kynurenin wurden wie bei der Tritiierung vorbehandelt, anschließend mehrmals in Methanol gelöst und wieder zur Trockne gebracht. Proben wurden papierchromatographisch in BEW untersucht. Von beiden Ansätzen wurden Spektren in 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,0, sowie in 1 N und 5 N HCl gemessen.

Applikation radioaktiver Vorstufen

Calliphorapuppen bekannten Alters werden nach GRASSMÄDER (1968) mit Nobecutan auf Pappkärtchen geklebt. Mit Hilfe einer Mikro-Injektionsspritze mit angesetztem Vinylanschlauch und ausgezogener Glaskapillare werden 2 µl der radioaktiven Lösung seitlich in das Abdomen injiziert, und die Einstichstelle mit einem Tropfen Nobecutan verschlossen. Unter diesen Bedingungen überlebten 90 Proz. der injizierten Tiere.

Die Imagines bekannten Schlupfdatums wurden durch Kälteeinwirkung betäubt und ihnen ebenfalls 2 µl der radioaktiven Lösung ventral in das Abdomen injiziert.

Tryptophan-(¹⁴C)-Dosis: 0,16 µg = 0,04 µC = 90000 dpm.

3-Hydroxy-L-kynurenin-(³H)-Dosis: 2,26 µg = 0,16 µC = 360000 dpm.

Die Puppen wurden nach 24 Std. durch Einfrieren bei -20°C abgetötet und aufbewahrt. Die Fliegen wurden nach 24 Std. mit CO_2 betäubt, mit Methanol fixiert und bei -20°C aufbewahrt.

Bei den "pulse-chase"-Versuchen wurden nach 24 Std. $1/3$ der injizierten Fliegen abgetötet und tiefgefroren. Die restlichen Fliegen erhielten 4 Tage lang als Trinkwasser eine $1,5 \text{ mM}$ -Lösung nicht markierten 3-Hydroxy-D,L-kynurens in Leitungswasser (jeden Tag frisch angesetzt). Dann wurde ein weiteres Drittel der Tiere abgetötet. Die übriggebliebenen Fliegen erhielten von da an Leitungswasser zum Trinken. Nach insgesamt 14 Tagen Lebenszeit wurden auch sie abgetötet und tiefgefroren.

Aufarbeitung radioaktiv markierter Tiere

Zur Isolierung des radioaktiv markierten Farbstoffes aus Fliegenköpfen wurde in Anlehnung an BUTENANDT und NEUBERT (1955) verfahren. Ein bis zwei Fliegenköpfe wurden mit 25 nicht radioaktiv markierten Köpfen als Trägermaterial zusammen im Ultra-Turrax unter Aceton zerkleinert und zentrifugiert. Das Sediment wurde zweimal mit Aceton und Methanol gewaschen. Aus dem Rückstand wurde mit dreimal 1 ml $0,5\text{-proz.}$ salzsaurem, SO_2 -haltigem Methanol der Farbstoff quantitativ herausgelöst. Im Rotationsverdampfer wurde die Lösung auf ein Volumen von 1 ml eingengt, und der Farbstoff durch Einleiten von SO_2 und Verdünnen mit Wasser ausgefällt.

Zur Isolierung von 3-Hydroxy-L-kynurenin-(^3H) wurden die Fliegenkörper einzeln im Ultra-Turrax unter Methanol zerkleinert und viermal mit je 4 ml Methanol extrahiert. Die Extrakte wurden vereinigt und im Vakuum zur Trockne gebracht. Der Rückstand wurde mit wenig Methanol aufgenommen, einige Kristalle nicht markiertes 3-Hydroxy-D,L-kynurenin als Trägersubstanz zugegeben und die Lösung papierchromatographisch in BEW aufgetrennt. Der im UV-licht lokalisierte 3-Hydroxy-kynurenin-Fleck wurde ausgeschnitten und die Aktivität nach Verbrennung bestimmt.

Isolierung der Pigmentgranula

1) Vorbereitung der Proben

Die Tiere wurden mit CO_2 betäubt und die Köpfe abgetrennt. Bei Locusta und Gryllus wurden die Augen aus den Köpfen herausgeschnitten, bei Calliphora gelangten ganze Köpfe zur Aufarbeitung.

Die Augen bzw. Köpfe von 50 Tieren wurden in 4 - 5 ml kalter, 0,3 M Sucroslösung (in Phosphatpuffer pH 7,0, 3 Proz. Mercaptoäthanol) in einem Pyrex-Zentrifugenglas (1 x 8 cm) mit einem passend angefertigten Plexiglasstempel zerquetscht. Der Extrakt wurde durch feinmaschige Perlongaze gesaugt und das Filtrat 5 Min. bei 180 g zentrifugiert. Der Überstand wurde dann bei 23000 g 10 Min. zentrifugiert und das Sediment in 2 - 3 ml o.a. 0,3 M Sucrose resuspendiert.

Von Gryllus wurden die ventrolateralen, nicht sklerotisierten Epidermisseitenstreifen am Abdomen vorsichtig abpräpariert und wie angegeben in 0,3 M Sucrose suspendiert.

2) Aufbau der Gradienten. Isolierung der Banden

a) Kontinuierliche Gradienten: Die Gradienten wurden mit für den jeweiligen Rotortyp passenden Mischkammern der Firma Hölzel Technik, Dorfen hergestellt. Als Ausgangslösungen für die Gradienten diente 1,2 - 1,8 M Sucrose in 0,05 M Phosphatpuffer pH 7,0 einerseits und eine Lösung von 4 g Sucrose in 7 ml Urovist (1,25 M an Sucrose) andererseits. Beide Lösungen enthielten 3 Proz. Mercaptoäthanol. Die Dichte der Gradienten reichte von 1,15 - 1,38 g/ml (bei 20°C).

Auf die Gradienten wurden 0,5 - 1 ml der Granulasuspension in 0,3 M Sucrose aufgetragen. Die Läufe dauerten 30 Min. - 21 Std. bei 175000 g, entsprechend 40000 RPM beim Rotor Sw 39 L und 31900 RPM beim Rotor Sw 41 Ti.

b) Stufengradienten: Verwendet wurden 0,6 - 2,2 M Sucroselösungen (in 0,05 M Phosphatpuffer, 3 Proz. Mercaptoäthanol) abgestuft in 0,2 M-Schritten. Je nach Rotortyp wurden pro Stufe 0,5 - 2 ml der Sucroselösungen übereinandergeschichtet. Bei einigen Gradienten wurden zunächst 0,5 - 1 ml Urovist oder Urovist-Sucrose-Lösung in die Röhrchen pipettiert. Die Läufe dauerten 10 - 180 Min., die g-Zahlen bewegten sich zwischen 24000 - 275000 g.

Die Isolierung der Granulabanden von den Gradienten erfolgte durch Anstechen der Röhrchen und Austropfen oder durch vorsichtiges Abpipettieren von oben. Waren die Granula auf den Röhrchenboden sedimentiert, konnte ohne weiteres dekantiert werden. Die isolierten Banden wurden in 5 - 10 ml 0,3 M Sucrose rehomogenisiert, mit 23000 g in 10 Min. abzentrifugiert und im gewünschten Volumen erneut rehomogenisiert. Je nach Bedarf wurde die Zentrifugation über gleiche oder variierte Gradienten wiederholt. Bei späteren Routineaufarbeitungen wurden Granula dreimal über Stufengradienten gereinigt.

Zur Isolierung des Farbstoffes wurden die Granula 1 - 4 mal (je nach Ziel des Versuches) mit je 10 ml 3-proz. Mercaptoäthanol gewaschen. Das Sediment wurde mit zweimal 0,5 ml 5-proz. salzsaurem, SO_2 -haltigen Methanol extrahiert, wobei der Farbstoff quantitativ in Lösung ging. Ungelöstes wurde abzentrifugiert. Xanthommatin aus Calliphora-Granula wurde durch Einleiten von SO_2 /Verdünnen mit Wasser umgefällt. Die Farbstoffe aus Locusta und Gryllus wurden direkt papierchromatographisch untersucht.

Um Ommochrom-Proteide in Lösung zu bringen, wurden Granula aus verschiedenen Anreicherungs-schritten mit 2 - 3 ml 0,04 M Cetyltrimethylammoniumbromid in 0,05 M Phosphatpuffer pH 7,0 (3 Proz. Mercaptoäthanol) verschieden lang bei $+20^\circ$ und $+5^\circ\text{C}$ extrahiert. Dann wurde vom Ungelösten abzentrifugiert und der Überstand bei $+5^\circ\text{C}$ aufbewahrt (in Anlehnung an AJAMI und RIDDIFORD, 1971).

Quantitative Bestimmungen

1) Farbstoff

100 μ l Granulasuspension werden in 0,9 ml 98 - 100-proz. Ameisensäure gelöst und einige Kristalle Ascorbinsäure zugegeben. Die Extinktion des reduzierten Farbstoffes wird in Halbmikroküvetten bei 492 nm gemessen. Eine Eichgerade wurde mit synthetischem Xanthommatin aufgestellt.

$$\epsilon_{1\text{ cm}}^{0,1\%} = 12,57.$$

2) Stickstoff

100 μ l Granulasuspension werden in einem Zentrifugenglas mit 5 ml 10-proz. Trichloressigsäure (w/v) versetzt. Nach 10 Min. wird das ausgefallene Protein abzentrifugiert und der Überstand vorsichtig abpipettiert. Die vorbereiteten Proben werden nach LANG (1958) verascht: Hierzu werden 0,2 ml Veraschungssäure (40 g K_2SO_4 , 2 ml Selenoxychlorid, H_2O ad 250 ml, 250 ml konz. H_2SO_4) zugegeben und im Sandbad auf 310 - 314°C erhitzt und 1 Std. dabei belassen.

Der Stickstoff wurde nach JACOBS (1959) mit Ninhydrin bestimmt; die Methode wurde geringfügig modifiziert. Bei jeder Bestimmung werden drei Leerwerte sowie Doppelproben eines Eichstandards (0,1 ml = 5,6 μ g N und 0,5 ml = 28 μ g N) mitgeführt. Für den Eichstandard werden 76,07 mg Über P_2O_5 getrocknetes Ammoniumsulfat ad 250 ml Wasser gelöst.

3) Succindehydrogenase (SDH)

100 - 500 µl Granulahomogenat werden in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 0,3 M Sucrose in 0,05 M Phosphatpuffer pH 7,0 (ohne Mercaptoäthanol) verdünnt und durch zweimalige Zentrifugation und Resuspension vom restlichen Mercaptoäthanol befreit. SDH wurde in den Granulahomogenaten in Anlehnung an KING (1967) bestimmt. Ansatz: 0,3 ml 0,3 M Phosphatpuffer pH 7,8; 0,3 ml 0,6 M Succinat pH 7,8 (mit NaOH eingestellt); 0,1 ml 0,03 M Kaliumhexacyanoferrat in Puffer; 0,05 ml 3-proz. Rinderserumalbumin in Puffer; 0,25 ml Wasser; 0,2 ml Probenlösung. Im Blindwert werden 0,3 ml Wasser anstelle von Succinat zugegeben. Die Messung erfolgt in Halbmikroküvetten bei 436 nm und 37°C und wird durch Zugabe der Granulasuspension gestartet. Die relative Enzymaktivität wurde nach KING (1967) berechnet.

Chromatographische Methoden

1) Papierchromatographie

Für alle Trennungen wurde das Papier Nr. 2043 b von Schleicher & Schüll verwendet. Aufsteigende Papierchromatographie erfolgte in den Systemen: Kollidin/0,5 M KH_2PO_4 2:3 (Oberphase), Butanol/Eisessig/Wasser (BEW) 4:1:1, Äthanol/Butanol/Ammoniak/Wasser (EBAW) 60:20:5:15, Methanol/Butanol/Benzol/Wasser (MBEW) 2:1:1:1. Die Ringpapierchromatographie von Omminen und Ommidinen erfolgte in dem System Ameisensäure/Methanol/Wasser/Salzsäure (AMWS) 68:15:12:2.

2) Dünnschichtchromatographie von Hydrolysaten

100 - 600 μ l-Proben von Granulasuspensionen wurden mit 5 ml 6 N HCl 24 Std. am Rückfluß gekocht und der entstandene Rückstand abzentrifugiert. Der Überstand wurde im Vakuum bei 30°C zur Trockne gebracht, die HCl mehrmals mit Wasser abgedampft und in 10 ml Wasser gelöst und dieser Rückstand zuletzt in 2 ml Wasser gelöst. 10 - 50 μ l des Hydrolysats wurden auf DC-Cellulose (Schichtdicke 0,1 mm) zweidimensional in 80-proz. Phenol chromatographiert.

3) Säulenchromatographie

Säulenmaterialien: Es wurden Perlonpulver Ultramid M 2 K 228 (BASF), Polyamidpulver MN Polyamid 6-AC (Macherey & Nagel), Ecteola (Schleicher & Schüll oder Macherey & Nagel) und Sephadex G 25/G 150 (Pharmacia) verwendet. Perlonpulver, Polyamidpulver und Sephadex wurden 12 Std. im Wasser gequollen und anschließend entgast. Ecteola wurde 2 Std. in 1 M Pyridin-Acetat-Puffer pH 7,0 gequollen und durch Dekantieren von feinen Anteilen befreit. Vor der Chromatographie wurde Ecteola mit 20 ml 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,0 pyridin-frei gewaschen.

Chromatographie an Ecteola: Ausgefälltes Dihydroxanthommatin wurde in 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,0 unter Zusatz von einigen Kristallen Ascorbinsäure suspendiert und auf eine 3 - 4 cm hohe, 9 mm weite Ecteolasäule aufgetragen. Der adsorbierte Farbstoff wurde bei aus Granula isoliertem, tritiummarkiertem Farbstoff zusätzlich mit 16 ml 3-proz. Mercaptoäthanol

gewaschen. Eluiert wurde bei 0,5 at Überdruck mit 3 M Pyridin-Acetat-Ascorbinsäure-Puffer pH 6,9 (100 mg Ascorbinsäure pro 100 ml Puffer). Bei der Ecteola-Cellulose von Macherey & Nagel wurde zunächst mit 10 ml 3 M Pyridin-Acetat-Ascorbinsäure-Puffer pH 6,9 und anschließend mit 5,2 M Puffer pH 6,9 eluiert. Fraktionsgröße 50 Tropfen. Fraktionen mit Extinktion größer als 0,06 wurden zur Trockne gebracht. Bei allen Aufarbeitungen wurde der Rückstand in 0,5-proz. salzsaurem, SO_2 -haltigen Methanol gelöst, der Farbstoff wie oben ausgefällt, in Puffer suspendiert und auf einer zweiten gleichartigen Säule rechromatographiert.

Chromatographie an Sephadex G 150: Auf die mit 0,04 M Cetyltrimethylammoniumbromid-Puffer equilibrierte Sephadex-Säule (0,9 x 60 cm) wurde 1 ml Extrakt aufgetragen und mit dem gleichen Puffer eluiert. Es wurden Fraktionen zu je 54 Tropfen aufgefangen; die Extinktion wurde bei 254 nm im Durchflußphotometer (in einigen Versuchen auch bei 492 nm) gemessen und aufgezeichnet. Zur Eichung der Säulen für die Molekulargewichtsbestimmung wurden 1-proz. Lösungen von Proteinen mit bekanntem Molekulargewicht unter den gleichen Bedingungen chromatographiert. Als Eichproteine wurden verwendet: Cytochrom c, Ovalbumin, Rinderserumalbumin, Aldolase, Katalase und Ferritin.

4) Disk-Elektrophorese in Polyacrylamidgel

Zur Disk-Elektrophorese in Polyacrylamidgel wurden über

Sephadex G 150 chromatographierte "Chromoproteid"-Proben von 100 - 150 µl eingesetzt. Die Läufe erfolgten bei Raumtemperatur mit 3 mA/Gel und dauerten 45 Min. Die Acrylamid-Gele waren 5-proz., als Elektroden- bzw. Gelpuffer wurde 0,05 M Phosphatpuffer pH 7,0 bzw. 0,05 M TRIS-HCl-Puffer pH 7,5 eingesetzt. Die Anfärbung der Banden erfolgte mit Coomassie Brilliant Blue nach WEBER und OSBORN (1969).

Isotopenmessungen

Alle Messungen der Impulsraten erfolgten mit einem Flüssigkeits-Scintillationszähler (Nuclear-Chicago, Modell 6801). Als Scintillationsflüssigkeiten wurden verwendet: a) "Dioxanfluor": 4 g "Omnifluor", 100 g Naphtalin, Dioxan ad 1 l, b) "Toluolfluor": 4 g "Omnifluor", thiophenfreies Toluol ad 1 l, c) "Phenäthyl-Toluolfluor" nach WOELLER (1961): 270 ml Phenäthylamin, 270 ml absolutes Methanol, 4 g "Omnifluor", Toluol ad 1 l.

Proben mit genügend hohen Impulsraten wurden direkt in die Zählflüssigkeit pipettiert. Proben mit niedrigeren Impulsraten wurden quantitativ auf 4 x 0,5 cm große Filterpapierstreifen aufgetragen und im sauerstoffgefüllten Kolben verbrannt (SCHÖNIGER, 1961). Je nach Art des Isotops wurde das bei der Verbrennung entstandene $^{14}\text{CO}_2$ mit Phenäthyl-Toluolfluor oder das Tritiumwasser mit Dioxanfluor aufgenommen. Mit Hilfe innerer Standards wurde die absolute Aktivität berechnet und unter Berücksichtigung der bei der Verbren-

nung auftretenden Verluste korrigiert. Wegen Phosphoreszenz in den Proben wurde stets wiederholt bis zur Konstanz der Zählwerte gezählt. Papierchromatogramme wurden in Streifen geschnitten und in Toluolfluor gezählt. Bei niedrigen Impulsraten wurde die Aktivität der Streifen nach Verbrennung bestimmt.

Elektronenmikroskopie

1) Vorbereitung der Präparate

Von mit CO₂ betäubten Tieren wurden die Köpfe abgetrennt, die Augen herausgeschnitten und sofort in das Fixierungsmittel gebracht. Dann erst wurde vorsichtig das restliche Gewebe von den Augen abpräpariert.

Von Granulahomogenaten wurden 0,1 - 0,5 ml Proben in 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,0 (0,3 M an Sucrose) suspendiert und in Eppendorf-Reaktionsgefäßen abzentrifugiert. Das Sediment wurde vorsichtig mit Fixierungsmittel überschichtet und nach etwa 10 Min. mit einem feinen Pinsel vom Boden des Gefäßes abgelöst.

2) Fixierung

Die Präparate wurden nach folgenden Methoden fixiert:

Fixierung in 5-proz. Glutaraldehydlösung in 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,0 (0,15 M an Sucrose) 2 Std. bei +5°C (SABATANI et al. in RUTHMANN, 1966). Nachfixierung in 2-proz. Osmium-

säure in Phosphatpuffer pH 7,0, 2 Min. - 2 Std. bei +5°C oder Nachfixierung mit Osmium-Bichromat (DALTON in RUTHMANN, 1966: 2 ml einer 5-proz. Kaliumbichromatlösung, mit 2,5 N KOH auf pH 7,0 eingestellt, wurden mit 2 ml einer 3,4-proz. NaCl-Lösung und 4 ml einer 2-proz. Osmiumsäurelösung in Phosphatpuffer pH 7,0 gemischt). Fixiert wurde 2 Std. bei +5°C.

Fixierung mit Kaliumpermanganat (LUFT in RUTHMANN, 1966). Es wurde mit einem Gemisch aus einer 1,2-proz. Kalimpermanganatlösung und 0,05 M Phosphatpuffer pH 7,4, 1:1, 2 Std. bei +5°C fixiert.

3) Entwässerung, Stückkontrastierung und Einbettung

Die Präparate wurden in der aufsteigenden Äthanolreihe mit Propylenoxyd am Schluß entwässert. Stückkontrastierung erfolgte nach WOHLFAHRT-BOTTERMANN in RUTHMANN (1966) mit 1-proz. Phosphorwolframsäure und 0,5-proz. Uranylacetat in der 70-proz. Alkoholstufe. Die entwässerten Präparate verblieben zunächst für 12 Std. rotierend in einem Gemisch aus Propylenoxyd und Durcupan 1:1 und wurden dann in reines Durcupan eingebettet. Die Aushärtung des Polyepoxyds erfolgte 24 Std. bei 40°C und dann 48 Std. bei 60°C.

4) Anfertigung der Schnitte und Aufnahmen

Schnitte von 500 - 600 Å Dicke wurden mit Glasmessern auf dem Ultratome III der Firma LKB, Stockholm, angefertigt.

Die Schnitte wurden auf Kupfer-Lochblenden mit Pioloform-F-Trägerfolien nach STOCKEM (1970) oder mit kohlebedampften Formvar-Trägerfolien (DOWELL in RUTHMANN, 1966) aufgezogen. Die Untersuchung der Schnitte erfolgte mit dem Zeiss-Elektronenmikroskop EM 9 S-2 bei 1950-, 8400- und 28000-facher Primärvergrößerung. Film: Agfa-Scientia 7 x 7 cm, Vergrößerungen auf Agfa-Papier Brovira BH 1, hart, extraweiß.

C) E R G E B N I S S E U N D D I S K U S S I O N

I. Versuche zur Isolierung und Anreicherung von Ommochromgranula

1) Vorversuche zur Isolierung von Ommochromgranula

Objekt

Als Objekt für die Vorversuche wurde die Schmeißfliege *Calliphora erythrocephala* M. aus folgenden Gründen gewählt: Einheitliches Tiermaterial kann zu jeder Jahreszeit in ausreichender Menge beschafft werden. Die sehr großen und reichlich pigmentierten Augen enthalten nur ein Ommochrom, das Xanthommatin. Es ist am besten untersucht und seine Struktur aufgeklärt (BUTENANDT et al., 1954; BUTENANDT und NEUBERT, 1955). Für quantitative Bestimmungen kann eine einfache Farbstoffbestimmung mit synthetischem Xanthommatin als Eichstandard durchgeführt werden.

Prinzip der Isolierung

Bei der Entwicklung eines Aufarbeitungsganges, in dem die Granula möglichst schonend in einer Sucroselösung suspendiert und über einen Dichte-Stufengradienten abgetrennt werden, mußten einige Voraussetzungen, betreffend das Ausgangsmaterial und die analytischen Methoden, geklärt werden. Das Prinzip der Granula-Abtrennung sei jedoch zunächst an einem Beispiel erläutert: Die abgetrennten Köpfe der Fliegen werden in einer Sucroselösung zerquetscht, der Extrakt durch feinmaschige Perlongaze gesaugt und das Filtrat zur Entfernung von Zellkernen und anderen schweren Bestandteilen bei 180 g abzentrifugiert. Die im Überstand enthaltenen Granula werden bei 23000 g abzentrifugiert, in einer Sucroselösung resuspendiert und über einen Dichte-Stufengradienten mit der Ultrazentrifuge abgetrennt. Abb. 1 zeigt eine solche Auftrennung der Granula.

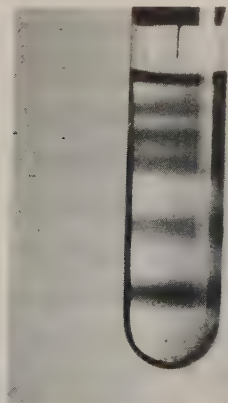


Abb. 1: Auftrennung von
Pigmentgranula mit einem
Stufengradienten (am Röhr-
chenboden beginnend: 1 ml
2,0/ 1 ml 1,8/ 1 ml 1,6/
0,5 ml 1,4/ 0,5 ml 1,2 M
Sucrose, Zentrifugation:
45 Min., 175000 g)

Es bilden sich mehrere Banden, ein großer Teil der Granula sedimentiert bis zum Röhrchenboden. Über den rötlichen Granulabanden liegen gelbbraun gefärbte Banden, die vor allem Mitochondrien neben geringen Mengen von Granula enthalten.

Verhinderung der Abspaltung von Farbstoff

Für die Bindung des Pigmentes an die Granula ist offensichtlich der reduzierte Zustand erforderlich. Bei Granula, die in Sucroselösungen (in 0,05 M Phosphatpuffer pH 7,0) ohne Reduktionsmittel suspendiert werden, zeigt sich eine starke Farbstoffabspaltung. Nach dem Abzentrifugieren der Granula sind die Überstände dunkelgelbbraun gefärbt und zeigen das für Xanthommatin typische Redoxverhalten. Durch Zusatz von 3 Proz. Mercaptoäthanol zu allen bei der Aufarbeitung verwendeten Lösungen wird die Oxydation und Abspaltung des Farbstoffes fast vollständig vermieden. Das zugesetzte Mercaptoäthanol zeigte in Konzentrationen von 0,1 - 5 Proz. keinen erkennbaren Einfluß auf die Lage der Granulabanden bei der Dichtegradientenzentrifugation. Die Stabilisierung kann auch mit Hilfe von Ascorbinsäure erfolgen; diese muß jedoch zunächst neutralisiert und die Lösungen müssen aufgrund der Zersetzung der Ascorbinsäure täglich frisch angesetzt werden.

Einfluß der Molarität des Homogenisationsmediums

Granulasuspensionen wurden bei +5 und +20°C in 0,2 - 1,0 M Sucrose bis zu 3,5 Std. stehengelassen und dann in einem

Stufengradienten (1,0/ 1,2/ 1,4/ 1,6/ 1,8 M) 20 Min. bei 43000 g zentrifugiert. Bei Inkubationszeiten bis 30 Min. zeigte sich kein erkennbarer Einfluß der Sucrosekonzentration auf die Lage der Granulabanden. Die Hauptbande der Granula lag bei der Stufe 1,6/ 1,8 M. Bei länger andauernder Inkubationszeit wanderten die Granula weniger weit. Dies war jedoch unabhängig von der bei der Vorinkubation verwendeten Sucrosekonzentration. Routinemäßig wurden die Granula mit einer 0,3 M Sucroslösung in 0,05 M Phosphatpuffer pH 7,0, 3 Proz. Mercaptoäthanol, aufgearbeitet und innerhalb von 30 Min. auf die Gradienten in den UZ-Röhrchen aufgetragen. Aufgrund dieser Versuche scheint es, daß die Osmolarität des Homogenisationsmediums - jedenfalls in dem angegebenen Bereich - keinen Einfluß auf das Sedimentationsverhalten der Granula hat (vergl. aber auf Seite 44 die Besprechung von "Größe und Dichte der Granula").

Einfluß des Alters der Pigmentgranula

Aus den Augen von 3, 11 und 18 Tage alten Fliegen wurden die Pigmentgranula gleichzeitig isoliert, und parallel über einen Stufengradienten zentrifugiert. Bei 3 Tage alten Fliegen bilden die Granula eine Bande an der Stufe 1,6/ 1,8 M aus. Bei 11 und 18 Tage alten Tieren sind die Granula auf niedriger molare Gradientenstufen verteilt. Ob dies auf eine Abnahme der Dichte oder eine Verringerung des Durchmessers der Granula zurückgeht, ist nicht geklärt. Routinemäßig wurden nur bis zu 4 Tage alte Fliegen aufgear-

beitet. Zu diesem Zeitpunkt ist die Pigmentsynthese abgeschlossen (LINZEN, 1963).

Rezentrifugation der Pigmentgranula

Die Reproduzierbarkeit der Zentrifugationsergebnisse wurde durch Rezentrifugation der Pigmentgranula geprüft: In mehrere Banden aufgetrennte Granula wurden isoliert und über gleiche Gradienten rezentrifugiert. Die Banden treten wieder an der gleichen Gradientenstufe wie bei der ersten Zentrifugation auf. Ein kleiner Teil der Granula findet sich in den darunter- und darüberliegenden Schichten.

2) Versuche zur quantitativen Bestimmung der Anreicherung

Die begründeten Zweifel, die an der Reinheit der von früheren Autoren "isolierten" Granula bestehen, ließen es wünschenswert erscheinen, den eigenen Versuchen quantitative Kriterien für eine erfolgte Reinigung der Granula zugrunde zu legen. Zur quantitativen Beurteilung der Anreicherung diente der Quotient aus Farbstoffgehalt und Stickstoff. Hierzu wurden zu Beginn, während und am Ende der Aufarbeitungen Granulaproben entnommen und der Farbstoff- und Stickstoffgehalt (abzüglich des Stickstoffes im Pigment selbst) bestimmt. Zusätzlich wurde die Abnahme des mitochondrialen Leitenzyms Succindehydrogenase während der Anreicherung gemessen. Die quantitative Bestimmung des Farbstoffes erfolgte durch die Messung der Extinktion bei 492 nm der in konz. Ameisensäure gelösten Proben.

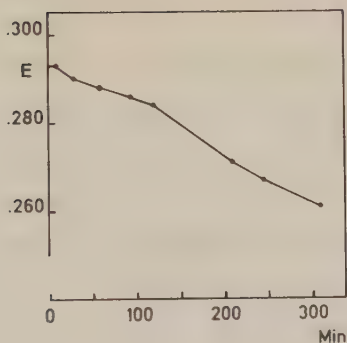


Abb. 2: Abnahme der Extinktion von Dihydroxanthommatin in konz. Ameisensäure bei Zimmertemperatur

Abb. 2 zeigt, daß die Extinktion des aus den Granula gelösten Dihydroxanthommatins bei 20°C nur langsam abnimmt (ca. 2 Proz. pro Std.). Die Extinktion des Farbstoffes wurde trotzdem sofort nach der Probennahme und der Lösung der Granula in konz. Ameisensäure gemessen. Zur Standardisierung der Farbstoffbestimmung wurde Xanthommatin synthetisiert, und Spektren in 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,0 und konz. Ameisensäure aufgenommen (Abb. 3).

Xanthommatin ist wie andere Ommochrome sehr schwer von letzten Begleitstoffen, wie Salzen, zu befreien und

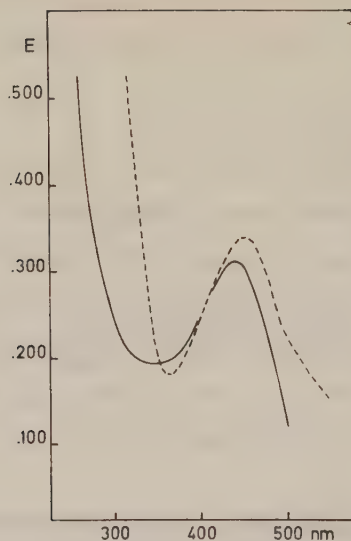


Abb. 3: Spektren von synthetischem Xanthommatin in 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,0 (—) und von Dihydroxanthommatin in konz. Ameisensäure (---)

quantitativ zu trocknen. Daher wurde durch Vergleich der erhaltenen spezifischen Extinktion mit den bei BUTENANDT et al. (1960) angegebenen molaren Extinktionen der tatsächliche Gehalt an Xanthommatin berechnet und aufgrund dieser Berechnung eine Eichgerade von in konz. Ameisensäure gelöstem synthetischen Dihydroxanthommatin aufgestellt. Die Extinktion ist streng linear von der Konzentration abhängig.

Succindehydrogenase (SDH)-Bestimmung

Bei den Aufarbeitungen stellte sich heraus, daß der Quotient Dihydroxanthommatin/Reststickstoff nur bedingt als Maß für die Anreicherung der Granula zu verwenden war. Trotz der ständigen Gegenwart von Reduktionsmittel wurde nämlich langsam Farbstoff abgespalten, was sich am Rückgang der Gesamtfarbstoffmenge ablesen ließ. Deshalb wurde als zweites biochemisches Kriterium für die Reinheit der Granula die Aktivität der Succindehydrogenase herangezogen, eines mitochondrialen Leitenzyms. Vorversuche zur SDH-Bestimmung zeigten, daß noch geringste Mengen des bei der Aufarbeitung verwendeten Mercaptoäthanol in den Granulaproben eine Enzymaktivität vortäuschen konnten. Das Mercaptoäthanol wurde durch dreimaliges Waschen der Granulaproben mit 0,3 M Sucrose in 0,05 M Phosphatpuffer pH 7,0 vor der SDH-Bestimmung entfernt. Die bei KING (1967) angegebene Methode wurde durch Verringerung der Volumina und Erhöhung der Molaritäten in der Empfindlichkeit gesteigert, so daß auch geringe Enzymaktivitäten in Granulasuspensionen noch meßbar waren. Die SDH-Aktivität erwies sich als direkt proportional zu den eingesetzten Granulamengen.

Aufbau des Gradienten

Nachdem sich gezeigt hatte, daß die partikulären Bestandteile eines Homogenats von Fliegenthoraces an der Stufe 0,8/ 1,4 M Sucrose stehenblieben, wurden Stufengradienten

aufgebaut, deren Molarität bis zur 2,2 M Sucrose reichte. Tab. 1, a) zeigt, daß bei einer Abstufung in großen Schritten (0,6/ 0,8/ 1,0/ 2,0 M) kaum eine Anreicherung erfolgt. Bei Einführung zusätzlicher Stufen mit 1,2 M und 1,4 M Sucrose und bei gleicher g-Zahl (43000 g) ist die Anreicherung etwas höher (Tab. 1, b₁₋₂). Durch Erhöhung der g-Zahl auf 83000 g bei 15 Min. Zentrifugationszeit werden die Verunreinigungen wieder mit den Granula zusammen in einer Bande gefunden (Tab. 1, c). Es wurde nun die beim Rotor Sw 39 maximal erreichbare g-Zahl von 175000 g verwendet. Da nun die Granula größtenteils bis zum Boden des Zentrifugenröhrchens sedimentierten, mußte eine Lösung wesentlich höherer Dichte, als wie sie 2 M Sucrose aufweist, zuunterst einpipettiert werden. Dazu diente eine 1,25 M Sucroselösung in "Urovist" (65 proz. wässrige Lösung des Methylglucaminsalzes der 3,5 Bisacetamido-2,4,6-trijodbenzoesäure), ein jodhaltiges Röntgenkontrastmittel. Diese Lösung hat eine geringere Viskosität und läßt sich daher leichter pipettieren und von den Röhrchen abzapfen als 2,2 M und 2,4 M Sucrose. Die Versuche (Tab. 1, d) führten zunächst nicht zu höheren Anreicherungen, eine Rezentrifugation der isolierten Granulabande erwies sich dagegen als deutliche Verbesserung (Tab. 1, e).

Wurden die Granula bei der Gradientenzentrifugation völlig sedimentiert, so wurden bei einer nachfolgenden Rezentrifugation höhere Anreicherungen erreicht (Tab. 1, f). Sie sind vermutlich darauf zurückzuführen, daß bei der Isolierung

experiment. Bedingungen	Aufbau des Gradienten // = isolierte Bande	g-Zahl x 1000	Zeit (Min.)	X/N _{roh}	X/N _{ger}	Anreich. faktor	n
a)	0,6/0,8/1,0//2,0 M Stufen	43.	10	1,18	1,64	1,39	5
b ₁)	0,8/1,0/1,2//2,0 M Stufen	43.			2,37	2,21	1
b ₂)	0,8/1,0/1,2/1,4// 2,0 M Stufen	43.	10	1,07	3,96	3,70	2
c)	0,8/1,0/1,2/1,4// 2,0 M Stufen	83.	15	0,96	0,60	0,62	2
d)	1,2/1,4/1,6//U+1,25 Stufen	175.	45	1,48	2,56	1,73	4
e)	1,2/1,4/1,6//U+1,25 Stufen, Rezentrifug.	175.	45	1,01	3,93	3,90	3
f ₁)	1,2/1,4/1,6/1,7/1,8/ 2,0// Boden des Röhr- chens	175.	45	1,29	7,15	5,54	3
f ₂)			90	1,57	9,40	5,99	4
f ₃)			180	1,66	10,48	6,32	2
g)	1,2/1,4/1,6/1,7// Rezentrifugation	175.	90	1,25	11,55	9,24	4

Tab. 1: Quantitative Bestimmung der Anreicherung von Granula aus Augen von Calliphora erythrocephala M. unter verschiedenen experimentellen Bedingungen.

Abkürzungen: X/N_{roh} und X/N_{ger} = Quotient Xanthomatin/Stickstoffgehalt vom Rohhomogenat (a) und von angereicherten Granula (b), (a):(b) = Anreicherungsfaktor, n = Anzahl der Bestimmungen, U+1,25 = 1,25 M Sucroslösung in Urovist

nung der Granula in Form eines Sedimentes weniger Verluste auftreten, und daß weiterhin die Zentrifugation der Granula über eine 1,8/ 2,0 M-Stufe eine bessere Abtrennung der Verunreinigungen bewirkt. Zentrifugation mit unterschiedlichen Laufzeiten ergab keine wesentlichen Unterschiede in der Anreicherung (Tab. 1, f_{1-3}). Für eine Rezentrifugation würde also eine kurze Laufzeit ausreichen. Die beste Anreicherung (Tab. 1, g), erhalten durch Rezentrifugation der Granula, war im Durchschnitt etwa neunfach und reproduzierbar. Der Reststickstoffgehalt betrug im Mittel 9 Proz. des Farbstoffgehaltes der angereicherten Granula.

Anreicherungsfaktor	SDH (Δ E/Min. x mg N) Rohhomogenat	Granulabande
keine Anreicherung	-	0,33
1,5	1,1	0,65
1,8	1,6	0,23
6,8	0,94	0,0

Tab. 2: Bestimmung der SDH-Aktivität in angereicherten Granulabanden bei verschiedenen Anreicherungszahlen.

Die SDH-Aktivität ist in Δ Extinktion/Min. x mg Stickstoff angegeben (vergl. Tab. 1).

Als weiteres biochemisches Reinheitskriterium diene bei einigen Aufarbeitungen auch die Bestimmung der Aktivität eines mitochondrialen Leitenzyms, der Succin-dehydrogenase (SDH) in den Granulaproben (Tab. 2).

Angegeben ist die Extinktionsabnahme/Min. und mg Stickstoff in Proben verschiedenen Reinheitsgrades. Es zeigt sich, daß schon bei der 6,8-fachen Anreicherung (eine Rezentrifugation) SDH-Aktivität mit der verwendeten Methode nicht mehr nachweisbar ist.

5) Elektronenmikroskopische Beurteilung der Anreicherung von Granula

Die bisherigen Aufarbeitungen hatten nicht eindeutig gezeigt, ob die verwendeten Kriterien (Farbstoff-, Stickstoff- sowie SDH-Bestimmung) zur Beurteilung des Reinheitsgrades der Granula ausreichten. Es mußte daher nach weiteren Kriterien gesucht werden. Erfolg versprach die Elektronenmikroskopie von Granulapräparationen. Verunreinigungen, wie Mitochondrienbruchstücke, Membranreste und sonstige Zellbestandteile, die biochemische Arbeiten an solchen Präparationen stören würden, könnten optisch festgestellt werden. Eine Durchmusterung von Schnitten aus verschiedenen Aufarbeitungen würde auch eine ungefähre Beurteilung der Anreicherung ermöglichen.

Zur Vorbereitung des Materials bewährte sich das Sedimentieren von Granulaprobe in die Spitzen von "Eppendorf"-Reaktionsgefäßen. Nach 2 x 2 Min. Zentrifugation in der Eppendorf-Zentrifuge bildet sich ein zusammenhängendes Sediment, das auch bei der anschließenden Fixierung und Entwässerung nicht auseinanderfällt. Versuche, die Granula vorher zu fixieren bzw. in der Fixierung abzucentrifugieren, ergaben ein bröckeliges, für die weiteren Arbeiten ungeeignetes Sediment.

Aufarbeitungen, die reproduzierbare und relativ hohe Anreicherungen ergeben hatten, wurden nun wiederholt und Proben aus den einzelnen Granulazonen im Elektronenmikroskop untersucht. Es zeigte sich dabei, daß bei etwa fünf- bis neunfacher Anreicherung noch andere Zellbestandteile (Mitochondrienbruchstücke und nicht definierbares Material) im Präparat enthalten waren. Es wurde daher auch die Möglichkeit geprüft, Granula in einem kontinuierlichen Gradienten anzureichern. Abb. 4 zeigt ein Photo einer solchen Präparation. Der Gradient war aus einer 1,2 M Sucroslösung und einer Lösung von Sucrose in Urovist (1,25 M an Sucrose) gemischt worden. Nach 4,5 Std. bei 175000 g bilden die vorgereinigten Granula eine Bande aus, die sich über einen größeren Bereich des Gradienten erstreckt. Elektronenmikroskopische Untersuchung von Proben aus verschiedenen Gebieten der

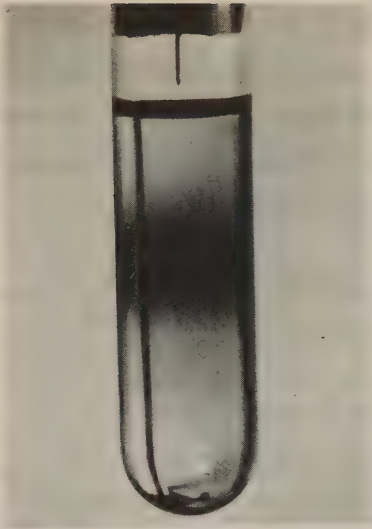


Abb. 4: Pigmentgranula
in einem kontinuierli-
chen Gradienten

Granulabande zeigte jedoch bei allen Versuchen, die unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt wurden, daß noch Verunreinigungen vorhanden waren.

Eine befriedigende Reinigung wurde erst nach dreimaliger Zentrifugation mit einem Stufengradienten erzielt (1,2/ 1,4/ 1,6/ 1,8/ 2,0/ 2,2 M; 275000 g, beim ersten Lauf 30 Min., beim zweiten und dritten Lauf je 15 Min.). Die Granula sedimentieren unter diesen Bedingungen zum größten Teil zum Boden des Röhrchens. An den darüberliegenden Stufen des Gradienten waren (im Gegensatz zum ersten Lauf) nach dem dritten Lauf keine gefärbten oder trüben Zonen erkennbar.

Den Gang einer solchen Anreicherung zeigen die EM-Bilder

1 - 3 (am Ende der Arbeit). EM-Bild 1 ist die Aufnahme eines Rohhomogenates. Man erkennt wenige stark elektrodendichte Granula neben vielen Mitochondrien, deren Membranen, weil die Schnitte nicht nachkontrastiert wurden, zum größten Teil nicht erkennbar sind.

EM-Bild 2 zeigt eine für die Gradientenzentrifugation vorbereitete Probe nach zweimaliger Vorzentrifugation (5 Min. bei 180 g, 10 Min. bei 23000 g). Bei diesem und bei dem in EM-Bild 3 gezeigten Präparat wurde nach der Glutaraldehydfixierung nur eine Stückkontrastierung angeschlossen. Aufgrund dieser Fixierungsbedingungen sind die Granula nicht mehr vollständig elektronendicht. Durch mechanische und osmotische Einflüsse sind die Granula wie die vorhandenen Mitochondrien zum Teil beschädigt.

EM-Bild 3 zeigt eine befriedigende Präparation, bei der nur noch Granula erkennbar sind. Der Inhalt der Granula ist teilweise (aufgrund des sehr harten Präparates) bei der Anfertigung der Schnitte mit dem Glasmesser herausgebrochen. Außerdem sind die Granula gestaucht, bei einigen ist der Inhalt herausgetreten und als diffuses Material zwischen den Granula im Präparat verteilt (siehe auch EM-Bild 13 und dazugehöriger Text). Die bei solchen Präparaten gleichzeitig durchgeführte analytische Bestimmung der Anreicherung ergab einen Reststickstoffgehalt unter der Nachweisgrenze und eine hohe Farbstoffausbeute.

Anreicherung von Ommochromgranula aus *Locusta migratoria* und *Gryllus bimaculatus*

Nachdem befriedigende Granulapräparationen von *Calliphora erythrocephala* vorlagen, wurde versucht, solche auch von *Locusta migratoria* und *Gryllus bimaculatus* zu erhalten. Granula wurden sowohl in kontinuierlichen als auch in Stufengradienten erfolgreich angereichert. EM-Bild 4 zeigt ein Rohhomogenat aus *Locusta*-Augen. Die Granula weisen eine konzentrische Schichtung auf, die im Abschnitt "Feinstruktur der Granula" besprochen werden soll. Die zahlreich vorhandenen Mitochondrien weisen wie im EM-Bild 1 nur schwachen Kontrast auf, soweit erkennbar, wirkt ihr Inneres blasig verändert. Eine besonders reine Präparation von *Locusta*-Granula (EM-Bild 5) wurde nach zweimaliger Zentrifugation erhalten. Dabei wurden die Granula zuerst in einem Stufengradienten (1,2/ 1,4/ 1,6/ 1,8/ 2,0 M-Sucrose; 45 Min. bei 175000 g) vorgereinigt und dann in einem kontinuierlichen Gradienten (1,2 M Sucrose und Urovist-Sucroselösung, 15 Std. bei 175000 g) nachgereinigt. Die Granula sedimentierten jedesmal bis zum Boden des Röhrchens. Durch zweimalige Zentrifugation in einem Stufengradienten (1,2/ 1,4/ 1,6/ 1,8/ 2,0/ 2,2 M Sucrose; 1 ml Urovist-Sucroselösung am Boden des Röhrchens, jeweils 30 Min. bei 275000 g) wurden ebenfalls reine Präparate erhalten.

EM-Bild 6 und 7 zeigen Granula aus Augen von *Gryllus*. EM-Bild 6 ist die Aufnahme eines Rohhomogenates. Hier sind nur relativ wenige Mitochondrien erkennbar. Die zahlreichen Granula sind gleichmäßig elektronendicht. EM-Bild 7

zeigt eine Präparation nach einfacher Zentrifugation in Stufengradienten (max. 2,0 M Sucrose; 15 Min. bei 275000 g). Mehrmalige Zentrifugation unter verschiedenen Bedingungen brachte keine reineren Präparationen. Die Granula bildeten eine Bande an der Stufe zwischen der 2,0 M-Sucroselösung und der Urovist-Sucroselösung aus.

Unter den gleichen Bedingungen wie bei der Anreicherung von Granula aus Augen von Gryllus wurden Granula aus den ventrolateralen, nicht sklerotisierten Seitenstreifen der abdominalen Epidermis von Gryllus aufgearbeitet. EM-Bild 8 zeigt ein Rohhomogenat, EM-Bild 9 die Granula nach einmaliger Zentrifugation. Hier ist noch ein erheblicher Anteil an Verunreinigungen zu erkennen. Durch ein- oder zweifache Rezentrifugation unter gleichen Bedingungen wurde das Ergebnis weder bei Augen- noch bei Epidermishomogenaten aus Gryllus verbessert.

II. Elektronenmikroskopische Untersuchung isolierter Granula

1) Vergleich verschiedener Fixierungs- und Kontrastierungsmethoden

LANGER (1967) zeigte mit elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Schnitten durch Augen von Calliphora erythrocephala, daß die Pigmentgranula der Wildform und der Mutanten white und chalky "von einer einfachen Membran umgeben sind und eine feine Granulierung aufweisen". Die Granula sind äußerst elektronendicht und nur durch kurze Einwirkungszeit (2 Min.)

der Osmiumsäurelösung gelang es, die Membran sichtbar zu machen. LANGER führte die reduzierende Wirkung der Granula (auf die Osmiumsäure) auf das Vorhandensein der reduzierten Form des Xanthommatins zurück. Aufgrund der Eigenschaften der Granula bzw. des in ihnen enthaltenen Farbstoffes ist für die Darstellung von Feinstrukturen solcher Granula die Fixierung und Kontrastierung mit Osmiumsäure wenig geeignet.

Es wurden daher verschiedene Fixierungs- und Kontrastierungsmethoden auf ihre Eignung zur Darstellung von Feinstrukturen bei Granula von Calliphora untersucht. EM-Bild 10 zeigt Granula aus dem Rohhomogenat, die 2 Std. mit Glutaraldehyd vorfixiert und dann 2 Std. mit Osmiumsäure nachfixiert wurden. Obwohl bei dieser Präparation der Kontrast sehr gering war, sind in den Granula keine weiteren Strukturen zu erkennen. Ihre Kontur scheint aus unregelmäßigen Schollen zusammengesetzt, keineswegs membranartig.

In weiteren Versuchen wurden angereicherte Granula 2 Std. mit Glutaraldehyd fixiert, 2 Std. mit Osmium-Bichromatlösung nachfixiert und eine Stückkontrastierung mit Phosphorwolframsäure und Uranylacetat im 70-proz. Alkohol (WOHLFAHRT-BOTTERMANN in RUTHMANN, 1966) durchgeführt. Die Granula weisen einen flockigen, weniger elektronendichten Inhalt auf (EM-Bild 11). Ähnliche Bilder sieht man auch bei LANGER (1967), z.B. in seiner Abb. 6. Im Inneren einiger Granula sind andeutungsweise fibrilläre Strukturen zu erkennen. Wurden die Granula mit einer 1,2-proz. Kalium-

permanganatlösung fixiert und anschließend eine Stückkontrastierung durchgeführt, so sind in fast allen Granula fibrilläre Innenstrukturen zu erkennen (EM-Bild 12).

Am besten scheint sich zur Darstellung der Granulastrukturen eine Fixierung mit Glutaraldehyd (2 Std.) und nachfolgende Stückkontrastierung zu eignen, wie EM-Bild 13 zeigt. Man erkennt in den Granula fibrilläre Strukturen, die größtenteils parallel angeordnet sind, sowie eine die Granula umgebende Membran. Einige Granula zeigen mehr oder weniger starke Beschädigungen, wobei der Granulainhalt teilweise verlorengeht und zwischen den Granula verteilt wird. Das diffuse Material neben den Granula, das auch im EM-Bild 3 zu sehen ist, geht auf diese Beschädigung zurück.

Für die Darstellung der Innenstrukturen wirkt sich möglicherweise folgender Umstand günstig aus: Nach LANGER (1967) liegt ein Teil des Farbstoffes in den Granula nicht gebunden vor. Bei der Aufarbeitung und Anreicherung geht dieser ungebundene Anteil des Farbstoffes verloren, da er in Lösung geht. So erhält man nach dem Abzentrifugieren der Granula mit 23000 g einen gelb, in Gegenwart von Mercaptoäthanol rot gefärbten Überstand. Die Strukturen in den isolierten Granula werden daher nicht in dem Maße vom Farbstoff verdeckt, wie das bei den Granula in situ der Fall ist.

2) Granula von Calliphora, Gryllus und Locusta im Vergleich

a) Feinstruktur

Die für Granula aus Calliphora-Augen typische Feinstruktur zeigen bei stärkerer Vergrößerung die EM-Bilder 14a und 14b. Im Inneren der von einer Membran umgebenen Granula sind kurze fibrilläre bis stäbchenförmige Strukturen erkennbar, die teilweise parallel, aber auch irregulär angeordnet sind. Sie stellen vermutlich die sogenannte "Matrix" dar, in die das Xanthommatin angelagert ist. Diese Strukturen erscheinen in den peripheren Bereichen der Granula meist dichter als im Zentrum. Da die Schnitte (ca. $700 \text{ \AA}$) sehr viel dünner sind, als die Durchmesser der Granula (ca. $5000 \text{ \AA}$), läßt sich über die tatsächliche Länge der Fibrillen keine Aussage treffen. Auch müßte dafür die Auflösung der Aufnahmen wesentlich verbessert werden. Bei Granula, welche aus verschiedenen Banden von Dichtegradienten isoliert worden waren, konnte elektronenmikroskopisch kein Unterschied der Feinstruktur festgestellt werden. Auch bei Granula in situ (EM-Bild 19) oder bei nur grob vorgereinigten Granula wurden die gleichen Strukturen gefunden.

Im Auge von Calliphora sind neben dem Xanthommatin nur noch Pterine (Sepiapterin und Tetrahydrobiopterin) vorhanden (PATAT, 1965). Pteringranula, wie sie SHOUP (1966) und FUGE (1967) bei Drosophila beschreiben, wurden jedoch nicht gefunden. Es wäre unwahrscheinlich, daß Pterine in eigenen gleichartig gebauten Granula wie Ommochromgranula vorlägen.

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Granula aus Augen von *Locusta* zeigen konzentrische Innenstrukturen (EM-Bilder 4, 5 und 15). Diese Strukturen treten sowohl bei Nachfixierung mit Osmium, als auch bei Stückkontrastierung der mit Glutaraldehyd fixierten Granula aus dem Rohhomogenat (EM-Bild 4), aus den Banden nach Zentrifugation (EM-Bild 5, 15 und 16) oder bei Granula in situ (EM-Bild 20a/b) auf. Eine ähnliche Feinstruktur wie sie bei den Granula von *Locusta* vorliegt, d.h. eine konzentrische Schichtung, fand MATSUMOTO (1965) in Pterinosomen aus Erythrophoren von *Xiphophorus helleri*; diese Pterinosomen sind 0,5 - 0,7 μm groß, sie enthalten im Inneren mehr als zehn konzentrische Membranstrukturen.

Die Granula von *Locusta* (EM-Bilder 5, 15 und 16) zeigen eine besonders starke Stauchung in einer Ebene und erhalten dadurch eine ellipsoide Gestalt. Durch mehrmalige Drehung ein und desselben Präparates läßt sich zeigen, daß die ellipsoide Form ein Schneidartefakt ist. Dies gilt auch für Granula von *Calliphora* (EM-Bild 14a/b). Die ellipsoiden Pigmentgranula in Abbildungen der Literatur lassen häufig eine Stauchung des Schnittes erkennen. Die größten Durchmesser der Granula liegen dann parallel zueinander. Dies ist z.B. der Fall bei Aufnahmen von *Locusta*-Augen (HORRIDGE und BARNARD, 1965, Fig.3) sowie aus Bienen-Augen (KOLB und AUTRUM, 1971, Abb.5). Die Granula sind vermutlich ursprünglich nahezu kugelförmig.

Die konzentrische Schichtung in den Granula aus *Locusta*-

Augen wirft die Frage auf, ob diese vielleicht dadurch entstanden ist, daß während der Larvalentwicklung in den einzelnen Häutungsstadien "Schicht auf Schicht" gelegt worden ist. Man müßte dann zunächst erwarten, daß die Zahl der Schichten etwa mit der Zahl der Larvenstadien von *Locusta* (in der Regel fünf) übereinstimmt. Dies scheint nicht der Fall zu sein. Weiterhin wäre zu fordern, daß die Granula in Larven kleiner sind als in adulten Tieren. Dazu wurden die Granuladurchmesser in EM-Aufnahmen von präparationen aus larvalen und imaginalen Augen vermessen. Zur Auswertung gelangten nur die größten Durchmesser der in den Präparaten ellipsoiden Granula. Ein Unterschied im mittleren Durchmesser konnte nicht nachgewiesen werden. Die Mittelwerte der Granuladurchmesser betrugen beim dritten Larvenstadium $0,630 \pm 0,0174 \mu\text{m}$ ($n=47$) und beim adulten Tier $0,633 \pm 0,027 \mu\text{m}$ ($n=52$). Aus dem dritten Larvenstadium isolierte Granula zeigen die gleiche konzentrische Schichtung des Granulainhaltes (EM-Bild 16) wie die Granula von geschlechtsreifen adulten Tieren.

Zwischen den Granula im Rohhomogenat (EM-Bild 4) und denen aus angereicherten Banden (EM-Bild 5) ist elektronenmikroskopisch kein Unterschied in der Feinstruktur feststellbar. Bei *Locusta* liegen aber neben Xanthommatin andere Ommochrome (Ommidine) in den Granula vor. Man könnte vermuten, daß diese verschiedenen Ommochrome nebeneinander an gleichen Strukturen gebunden sind. Das Ergebnis einer ringpapierchromatographischen Auftrennung der Farbstoffe von Granula, die aus verschiedenen Gradientenzonen isoliert wurden,

spricht sehr für diese Vermutung. Hierzu wurden Granula aus Augen von *Locusta* in einem kontinuierlichen Gradienten (gemischt aus 1,2 M Sucrose und 1,5 M Sucrose in Urovisk, 1 ml der zweiten Lösung als "Kissen" am Boden des Röhrchens) 17 Std. bei 175000 g zentrifugiert. Es wurde eine schwache Bande (1) und ein Sediment (2) erhalten (Abb. 5). Die Granula wurden isoliert, die Farbstoffe mit 5-proz. salzsaurem, SO_2 -haltigem Methanol extrahiert und im System AMWS ringpapierchromatographisch aufgetrennt. Zusätzlich wurden nur grob vorgereinigte Granula gleichermaßen aufgearbeitet. Alle drei Granulaproben zeigten das gleiche Bandenmuster bei der Papierchromatographie. Es traten bei den Proben jeweils zwei Banden auf, die in ihren Rf-Werten identisch waren (Abb. 5).

Das gleiche Ergebnis würde man allerdings erhalten, wenn Granula mit unterschiedlichem Farbstoff, aber gleicher Dichte zusammen in einer Zone des Gradienten sich ansammeln würden. Dies ist aber aufgrund der Dichtebestimmung von Granula durch isopyknische Zentrifugation unwahrscheinlich: Die Granula aus *Calliphora*, *Locusta* und *Gryllus*, welche verschiedene Ommochrome enthalten, zeigen auch verschiedene Dichte.

Bei Granula aus Augen von *Gryllus* sind keine Feinstrukturen erkennbar; der Inhalt der von einer Membran umgebenen Granula ist homogen (EM-Bilder 6, 7 und 17). Ebenso konnten bei den aus der Epidermis isolierten Granula mit verschiedenen

Abb. 5



Abb. 6

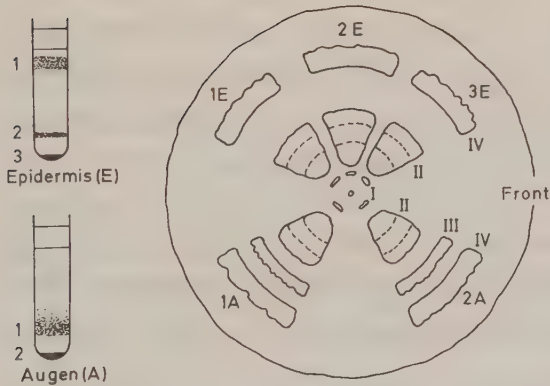


Abb. 5 und 6: Auftrennung von Granula in einem kontinuierlichen Gradienten und ringpapierchromatographische Auftrennung der Farbstoffextrakte von Granulaproben aus den Gradientenzonen (I=Auftragungszone, II=Omnine (blau), III= Ommidin (orange), IV=gelbe Bande). 5: Granula aus Augen von *Locusta*. 6: Granula aus Augen und Epidermis von *Gryllus*.

Fixierungs- und Kontrastierungsmethoden keine Feinstrukturen sichtbar gemacht werden (EM-Bilder 8, 9 und 18). Granula aus Augen von *Gryllus* enthalten Ommin, Ommidin und Xanthommatin; bei Granula aus den Epidermisseitenstreifen fehlt Ommidin (LINZEN, 1974). Da in Rohhomogenaten aus Augen und Epidermis Granula mit unterschiedlichem Aufbau elektronenmikroskopisch nicht nachweisbar sind, ist wie bei den Granula von *Locusta* zu vermuten, daß die verschiedenen Farbstoffe in den Granula nebeneinander vorkommen und an einer einheitlichen Matrix abgelagert werden. Granula aus Augen und Epidermis von *Gryllus* wurden unter den gleichen Bedingungen wie Granula von *Locusta* in einem kontinuierlichen Gradienten 21 Std. lang zentrifugiert (Abb. 6). Ringpapierchromatographie der Farbstoffextrakte aus den isolierten Zonen ergab keinen Unterschied im Farbstoffgehalt, außer daß bei Granula aus der Epidermis die orange gefärbte Bande III (Ommidin) fehlte.

Das Ergebnis unterstützt den auch bei Granula von *Locusta* erhaltenen Befund, daß bei Orthopteren verschiedene Ommochrome an gleichen Strukturen abgelagert werden.

b) Größe und Dichte der Granula

Die aus den elektronenmikroskopischen Aufnahmen ermittelten Granuladurchmesser liegen im Bereich der Daten, die in der Literatur über Insektenaugen erscheinen (vergl. LINZEN, 1974). Da in fast allen Fällen die Granula gestaucht sind, wurde der Mittelwert aus größtem und kleinstem Durchmesser als theoretischer Durchmesser angenommen. Die Granula aus

Calliphora (Rohhomogenat) sind $0,4\text{ }\mu\text{m}$, in seltenen Fällen bis $0,5\text{ }\mu\text{m}$ groß. Die isolierten Granula zeigen die gleiche Größe. Bei den Granula in situ (Nebenpigmentzellen) wurde als maximaler theoretischer Durchmesser jedenfalls $0,5\text{ }\mu\text{m}$ gefunden. Die bei LANGER (1967) veröffentlichten Aufnahmen von Granula zeigen in etwa die gleichen Abmessungen.

Bei Locusta beträgt der theoretische Granuladurchmesser bei den Granula im Rohhomogenat und in isolierten Banden maximal $1,2\text{ }\mu\text{m}$, bei den Granula in situ ebenfalls. Dies entspricht Werten, die aus den Abbildungen bei HORRIDGE und BARNARD (1965) herauszumessen sind. Bei Tieren des dritten Larvenstadiums wurden zwar maximal $0,9\text{ }\mu\text{m}$ als größter theoretischer Durchmesser erhalten, die statistische Prüfung der Mittelwerte zeigt jedoch keine Signifikanz des Unterschiedes. Die Granula aus den Augen von Gryllus messen im Rohhomogenat maximal $1,0\text{ }\mu\text{m}$ im Durchmesser, in ganz seltenen Fällen sogar $1,4\text{ }\mu\text{m}$. Isolierte Granula sind maximal $0,85\text{ }\mu\text{m}$ groß. Die Granula scheinen bei der Anreicherungsprozedur also etwas zu schrumpfen. Bei Granula aus den Epidermisseitenstreifen scheint dies nicht der Fall zu sein; Granula aus dem Rohhomogenat zeigen gegenüber isolierten Granula keinen Größenunterschied. Sie sind jedoch mit $0,5\text{ }\mu\text{m}$ wesentlich kleiner als die Granula aus den Augen.

Es wurde versucht, durch isopyknische Zentrifugation die Dichte verschiedener Granula zu bestimmen. Bei der isopyknischen Zentrifugation in einem kontinuierlichen Gradienten

bilden die Teilchen Banden aus, die auch bei Verlängerung der Zentrifugationszeit ihre Lage nicht mehr verändern. Die Dichte der Teilchen ist dann gleich der Dichte des sie umgebenden Lösungsmittels.

Bei Verwendung von ungereinigten Calliphora-Granula wird eine sehr breite Bande erhalten. Die Bandenmitte konnte nicht genau lokalisiert werden. Daraus ist zu folgern, daß die Granula beim adulten Tier in der Dichte (und Durchmesser) nicht einheitlich sind, und daß diese Größen statistisch verteilt sind. Ein anderes Bild erhält man, wenn die Granula zunächst über einen Stufengradienten zentrifugiert werden, und nur der Teil (allerdings der größere Teil) isopyknisch rezentrifugiert wird, welcher durch 2 M Sucrose auf den Röhrchenboden sedimentiert ist. Bei einem kontinuierlichen Gradienten, gemischt aus 1,2 M Sucrose und einer 1,5 M Sucroselösung in Urovist bildeten nach 16 Std. bei 175000 g (Rotor Sw 41) die Granula eine schmale Bande aus, deren Dichte durch Abpipettieren und Auswiegen bestimmt wurde. Es ergab sich eine mittlere Dichte von $1,26 \pm 0,01$ g/ml ($n=6$) bei 21°C. Bei 13-stündiger Zentrifugation (Rotor Sw 39) wurde eine Dichte von $1,29 \pm 0,017$ g/ml ($n=12$) bei 22°C erhalten.

Bei Granula von Locusta und Gryllus (aus Augen und Epidermis) gelingt die Dichtebestimmung durch isopyknische Zentrifugation nicht. Die Granula sedimentieren unter den oben aufgeführten Bedingungen zum größten Teil bis zum Boden des

Röhrchens. Ihre Dichte ist demnach größer als 1,37 g/ml. Eine Zentrifugation in Caesiumchlorid erschien ungeeignet, da eine sehr hohe Salzkonzentration eine Übermäßig artifizielle Bedingung dargestellt hätte.

Größe, Dichte und Feinstruktur der Granula von Calliphora, Locusta und Gryllus sind in Tab. 3 zusammengefaßt.

Ausgangs- material	Farbstoffe	Größe µm	Dichte g/ml	Feinstruktur im EM-Bild
Calliphora, Augen	Xanthommatin	0,4	1,28	faserig
Locusta, Augen	Ommidin, Kryptommidin, Xanthommatin	1,0	> 1,37	konz. Schich- tung, keine Fasern
Gryllus, Augen	Ommin, Ommidin, Xanthommatin	1,0 ⁺	> 1,37	homogen
Gryllus, Epidermis	Ommin, Xanthommatin	0,5	> 1,37	homogen

Tab. 3: Größe, Dichte und Feinstruktur der Ommochromgranula von Calliphora, Locusta und Gryllus. ⁺ = Granula schrumpfen während der Zentrifugation auf 0,85 µm.

3) Feinstrukturen der Granula in situ

Durch geeignete Fixierungs- und Kontrastierungsbedingungen konnten in den isolierten Augen-Granula von Calliphora Strukturen der "Matrix" sichtbar gemacht werden. Vorteilhaft

hatte sich dabei der (ungewollte) partielle Verlust von Xanthommatin aus den Granula während der Dichtegradientenzentrifugation ausgewirkt. Daß in den fibrillären Strukturen ein Artefakt vorliegt, scheint aufgrund ähnlicher Ergebnisse trotz verschiedener Methoden bei der Fixierung und Kontrastierung wenig wahrscheinlich. Trotzdem mußte durch Elektronenmikroskopie der Granula in situ untersucht werden, ob diese Feinstrukturen nativ sind oder ob die Struktur der Granula sich unter dem Einfluß der Dichtegradientenzentrifugation verändert.

Aus Köpfen von *Calliphora* wurden die Augen herausgeschnitten, sofort zur Fixierung in eine 5-proz. Glutaraldehydlösung (0,15 M an Sucrose) gebracht und dann erst das restliche Gewebe vorsichtig abpräpariert. Nach der Fixierung (2 Std.) wurde bei der Entwässerung des Präparates eine Stückkontrastierung in der 70-proz. Alkoholstufe vorgenommen (wie bei dem in EM-Bild 13 gezeigten Präparat). Granula der Nebenzellen des so behandelten Auges von *Calliphora* sind in EM-Bild 19 zu sehen. Die Ebene des Schnittes liegt fast senkrecht zu den Ommatidien und in der Höhe der Zellkerne der Sinneszellen. Wie bei den Granula nach der Dichtegradientenzentrifugation (EM-Bild 13) sind im Innern dieser Granula fibrilläre Strukturen erkennbar, wenn auch nicht so deutlich, da sie stärker vom Farbstoff verdeckt werden. Eigenartig ist aber, daß auch außerhalb einer Anzahl von Granula fädige Strukturen erkennbar sind und daß solche Granula deutliche Auflösungserscheinungen

zeigen. Eine einheitliche Membran ist dann nicht mehr vorhanden. Dies könnte allerdings auf einen Fixierungsartefakt zurückzuführen sein.

Unter den gleichen Bedingungen wurden auch Augen von *Locusta* untersucht. Die in den EM-Bildern 4 und 5 sichtbaren konzentrischen Innenstrukturen der Granula sind bei Aufnahmen von Schnitten des ganzen Auges nur in einzelnen Zellen direkt erkennbar (EM-Bild 20a). Dies könnte damit begründet werden, daß die Strukturen von Farbstoff verdeckt sind. Bei *Locusta* liegen neben Xanthommatin andere Ommochrome (Ommidine) in den Granula vor. Wie bei *Calliphora* scheint aber auch hier ein Teil der Farbstoffe locker oder gar nicht gebunden zu sein. Bei der Isolierung der Granula geht dieser Anteil verloren. Der nach dem Abzentrifugieren der Granula mit 23000 g erhaltene Überstand ist stets stark gefärbt. Die in den sehr elektronendichten Granula vorhandene konzentrische Schichtung zeigt sich jedoch daran, daß beim Schneiden des Präparates runde Ausbrüche in den Granula auftreten. Bei *Calliphora* entstehen niemals konzentrische Ausbrüche, dagegen Risse, welche ebenfalls auf fibrilläre Struktur der Matrix schließen lassen. Bei einigen Granula ist diese aus mehreren konzentrischen Schichten bestehende Struktur darüberhinaus deutlich zu erkennen, wie eine stärkere Vergrößerung (EM-Bild 20b) zeigt. Die bei Granula von *Calliphora* zur Darstellung der Feinstrukturen besonders geeigneten Fixierungs- und Kontrastierungsmethoden scheinen für Granula von *Locusta* weniger vorteilhaft zu sein.

4) Vergleich der Granula aus Augen von Wildform und Mutante white (Männchen) bei Calliphora erythrocephala

Die Mutante white (w; TATE, 1947) unterscheidet sich im Phänotypus von der Wildform durch die gelbgefärbten Augen der weiblichen Tiere. Bei ihnen fehlen die roten Farbstoffe fast völlig. Nach LANGER (1967) geht die Färbung auf gelbe Granula zurück, die ausschließlich oxydiertes Xanthommatin enthalten. Die männlichen Tiere der Mutante w zeigen die normale Augenfärbung der Wildform.

Bei einer vergleichenden Dichtegradientenzentrifugation der Granula von Wildform und Männchen der Mutante w zeigten sich jedoch Unterschiede im Sedimentationsverhalten. Homogenate der Granula aus den Augen der beiden Rassen wurden in einem Stufengradienten (1,2/ 1,4/ 1,6/ 1,8/ 2,0/ 2,2 M Sucrose) 30 Min. bei 98000 g und in einem anderen Versuch bei 175000 g zentrifugiert. Die Granula der Männchen der Mutante w bildeten jedesmal eine Bande an der Stufe 1,8/ 2,0 M aus. An den übrigen Stufen waren nur sehr wenige Granula erkennbar. Die Granula der Wildform sedimentieren unter den gleichen Bedingungen bis zum Boden des Röhrchens. Die Granula unterscheiden sich somit in der Dichte (da sie in den Aufnahmen von LANGER nicht erkennbar kleiner sind): Der größte Teil der Granula der Wildform besitzt eine Dichte $>1,28$ g/ml, da sie 2,2 M Sucrose noch durchwanderten (siehe S. 33). Von den Granula der Männchen der Mutante w konnten die 2,0 M-Stufe nur noch wenige passieren, die

Dichte des größten Teiles dieser Granula dürfte also bei 1,25 g/ml liegen. Ob das Sedimentationsverhalten osmotischen Einflüssen und einer daraus folgenden Veränderung der Granula unterliegt, kann vorerst nicht beurteilt werden. Altersunterschiede der Granula als Grund für die unterschiedliche Sedimentation scheiden aus, da beide Versuchsgruppen gleich alt (15 Tage) waren. Der Dichteunterschied könnte vielleicht auf einen geringeren Farbstoffgehalt der Granula der white Männchen zurückzuführen sein. Bei den weiblichen Tieren dieser Mutante ist der Farbstoffgehalt nach LANGER (1967) wahrscheinlich auf weniger als 1/100 verringert.

Für die elektronenmikroskopische Untersuchung wurden Granula von white Männchen über den oben angegebenen Stufengradienten 30 Min. bei 275000 g zentrifugiert. Es trat wieder eine starke Bande an der Stufe 1,8/ 2,0 M Sucrose auf, ein Teil der Granula sedimentierte zum Boden des Röhrchens. EM-Bild 21 zeigt eine Aufnahme dieser Granula. Ein Unterschied zu den Granula der Wildform ist nicht feststellbar, es sind die gleichen fibrillären Strukturen erkennbar. Bei der Durchmusterung der Aufnahmen verschiedener Schnitte von Granula aus white Männchen zeigte sich jedoch allgemein eine stärkere Beschädigung der Granula.

5) Spektren von angereicherten Granula

Die Anreicherung der Ommochrom-Granula erlaubt auch Aussagen über die Bedeutung der Bindung der Farbstoffe durch Vergleich

von Absorbtionsspektren. Angereicherte Granula aus Augen von *Calliphora erythrocephala*, *Locusta migratoria* und *Gryllus bimaculatus* sowie aus der Epidermis von *Gryllus bimaculatus* wurden in 0,3 M Sucrose (in Phosphatpuffer pH 7,0, 3 Proz. Mercaptoäthanol) suspendiert und Spektren im Bereich von 350 - 650 nm aufgenommen. Die erhaltenen Extinktionskurven sind in den Abbildungen 7 - 10 wiedergegeben.

Calliphora erythrocephala (Wildform):

Die Spektren zeigen ein Hauptmaximum bei 533 nm sowie ein Nebenmaximum bei 382 nm (Abb. 7). Vergleicht man die Wellenlängen mit den Werten für Dihydroxanthommatin in neutralem Phosphatpuffer (Ascorbinsäurezusatz) (LINZEN, 1974), so findet man eine gute Übereinstimmung der Lage der Nebenmaxima bei 382 nm. Das Hauptmaximum ist dagegen durch die Bindung an die "Matrix" von 495 nm nach 533 nm bathochrom verschoben. Dabei ist die Bande stark verbreitert und zeigt eine Schulter bei etwa 570 nm. LANGER (1967) fand bei mikrospektrometrisch gemessenen Extinktionskurven von Pigmentgranula in abgekappten Augen von *Calliphora* und in Quetschpräparaten ebenfalls eine starke bathochrome Verschiebung. Beim Vergleich muß aber berücksichtigt werden, daß bei der Isolierung der Granula zur Stabilisierung der Farbstoffbindung Mercaptoäthanol zugesetzt werden mußte. Dadurch wurde auch das in den gelbbraunen Granula vorhandene, angeblich nicht gebundene Xanthommatin (LANGER, 1967) zu Dihydroxanthommatin reduziert. Andererseits ist unge-

klärt, wieviel von dem nicht proteingebundenen Anteil bei der Aufarbeitung in Lösung geht. Die Spektren können daher nur mit den von LANGER bei roten Granula in Quetschpräparaten erhaltenen verglichen werden. Diese zeigen bei 386 nm ein Nebenmaximum; das Hauptmaximum, bei verschiedenen Messungen im Bereich von 538 - 552 nm, ist geringfügig weiter bathochrom verschoben als bei den angereicherten Granula. Die Kurven zeigen den gleichen steilen Abfall bei 600 nm.

Locusta migratoria:

Das Spektrum von Granula aus Augen von *Locusta* (Abb. 8) zeigt eine Bande bei 442 nm, die sehr langsam bis 600 nm abfällt. Isoliertes Ommidin aus Augen von *Locusta migratoria* zeigt ein Maximum bei 430 nm, gemessen bei einem pH von 7,8 (LINZEN, 1966). In Abbildung 8 wurde dieses Spektrum im entsprechenden Wellenlängenbereich eingezeichnet. Die bathochrome Verschiebung beträgt nur 12 nm. Der sehr langsame Abfall könnte - wenn er nicht auf Bindung an die Matrix zurückgehen sollte - auch durch andere, im Auge von *Locusta* in geringen Mengen vorkommende Farbstoffe (Xanthommatin und Kryptommidin; LINZEN, 1966) verursacht werden.

Augen und Epidermis von *Gryllus bimaculatus*:

Das Spektrum von Granula aus *Gryllus*-Augen (Abb. 9) weist drei flache Maxima bei ca. 380, 440 und 505 nm auf. Das Maximum bei 380 nm ist vermutlich das Nebenmaximum des Dihydroxanthommatins. Das Maximum bei 440 nm kann durch eine bathochrome Verschiebung der Ommidinbande bei 430 nm erklärt

werden. Das Maximum bei 505 nm dürfte durch Ommine zustande kommen; die Spektren isolierter Ommine aus *Gryllus* zeigen (in sek. Natriumphosphat) Maxima zwischen 510 und 536 nm (LINZEN, 1974).

In den Granula der abdominalen Epidermis fehlt das Ommidin (LINZEN, 1974). Im Spektrum dieser Granula (Abb. 10) fehlt dementsprechend die Bande bei 440 nm. Im Bereich von 380 nm ist eine leichte Schulter erkennbar. Ein eindeutiges Maximum liegt bei 520 nm. Bei der gleichen Wellenlänge liegt das Absorptionsmaximum der meisten Ommingemische in Lösung (LINZEN, 1974), was vielleicht bedeuten könnte, daß das Ommidin in den Epidermisgranula nicht an Protein gebunden ist.

Vergleichend kann man also feststellen, daß die Absorption sichtbaren Lichtes durch die Bindung der Ommochrome in unterschiedlichem Maße erweitert wird. Geringfügig geschieht dies durch Ommidin und Ommidin, am stärksten wirksam ist Xanthommatin, das nach LANGER (1967) "als Kantenfiter wirkt und damit den Rotgipfel der spektralen Empfindlichkeit des Auges bei Messung mittels des Elektoretinogramms hervorruft". Xanthommatin scheint in der gebundenen Form ein besonders geeignetes Augenschirmpigment darzustellen. Es ist von Interesse, daß es die Ommine in wechselnden Mengen begleitet, aber erst bei den besonders weit entwickelten Insekten, den Dipteren, als einziges Ommochrom im Auge auftritt.

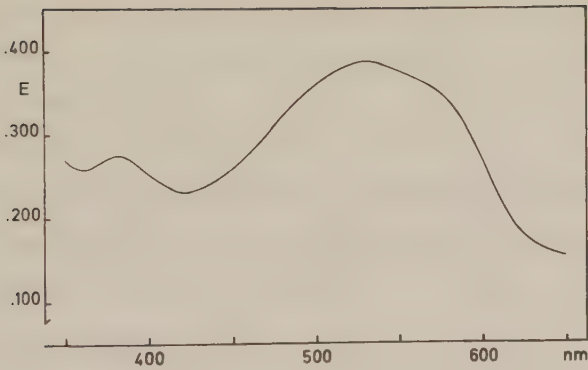


Abb. 7: Spektrum von angereicherten Granula aus *Calliphora erythrocephala*

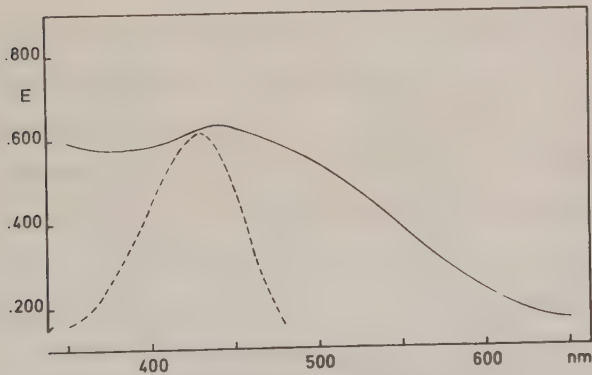


Abb. 8: Spektren von angereicherten Granula aus *Locusta migratoria* (—) und Ommidin (---) (LINZEN, 1966)

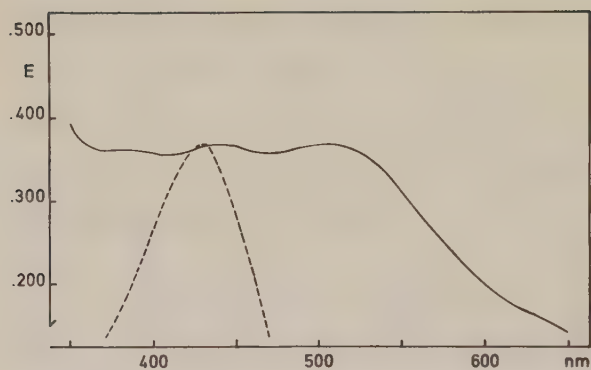


Abb. 9: Spektren von angereicherten Granula aus Augen von *Gryllus bimaculatus* (—) und Omnidin (---) (LINZEN, 1966)

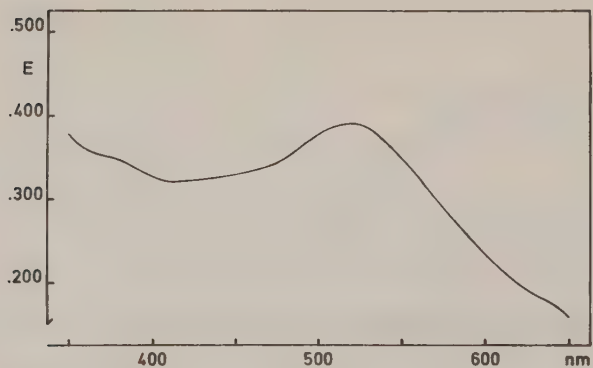


Abb. 10: Spektrum von angereicherten Granula aus abdominalen Seitenstreifen von *Gryllus bimaculatus*

6) Vorversuche zum Nachweis eines Ommochrom-Proteids

YOSHIDA et al. (1967) und AJAMI und RIDDIFORD (1971) benutzten zur "Isolierung" von Ommochrom-Proteiden ein anionisches Detergens, das Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB). In eigenen Versuchen wurden CTAB und ein weiteres, kationisches Detergens, Dimethylbenzolsulfonsäure (DBS), auf ihre Eignung untersucht, aus Ommochrom-Granula ein Chromoprotein zu isolieren.

Lösungsversuche

Gereinigte Granula aus Augen von 1 Tag alten Fliegen (*Calliphora erythrocephala*) wurden in CTAB- und DBS-Lösungen (in 0,05 M Phosphatpuffer, 3 Proz. Mercaptoäthanol) suspendiert. Mit DBS-Lösungen verschiedener Molarität (0,01/ 0,04/ 0,08/ 0,12 M) gelang es nicht, in maximal 16-stündiger Extraktion bei +5°C ein Chromoprotein in Lösung zu bringen. Nach dem Abzentrifugieren des Rückstandes war die DBS-Lösung farblos und ergab mit 10-proz. Trichloressigsäure keinen Niederschlag. Mit CTAB-Lösungen wurde schon nach kurzer Extraktionszeit eine dunkelrot gefärbte Lösung erhalten. Die Variation der CTAB-Konzentration zwischen 0,01 und 0,15 M ergab keine sichtbaren Unterschiede. Der Rückstand nach Zentrifugation ist nach vierstündiger Extraktion bei Raumtemperatur oder bei Extraktion über Nacht bei +5°C farblos. Für die weiteren Versuche zur Charakterisierung von Chromoproteiden aus Granula wurde daher in Anlehnung an AJAMI und RIDDIFORD (1971) eine 0,04 M CTAB-Lösung verwendet, wobei zur Vermeidung der Abspaltung von Farbstoff 3 Proz. Mercaptoäthanol

nol zugesetzt wurden.

Die mit 0,04 M CTAB aus den Granula erhaltenen, gefärbten Extrakte wurden mit dem gleichen Puffer über Sephadex G 150 filtriert. Es wurden zwei im UV bei 254 nm absorbierende Banden erhalten, die erste davon absorbierte zusätzlich bei 492 nm im sichtbaren Bereich. Die Elutionsvolumina waren gut reproduzierbar. Die Molekulargewichtsbestimmung mit Hilfe von Eichproteinen ergab für die erste Bande ein Molekulargewicht von etwa 96000, für die zweite (nur im UV absorbierende) ein Molekulargewicht von 57000.

Zur Kontrolle wurde synthetisches Xanthommatin unter gleichen Bedingungen mit CTAB behandelt und über Sephadex G 150 filtriert. Überraschenderweise wurden dabei Banden mit denselben Elutionsvolumina und den gleichen daraus resultierenden Molekulargewichten erhalten. Der Verdacht, daß nur Farbstoff ohne Protein mit CTAB extrahiert worden war, wurde durch Disk-Elektrophorese der angeblichen Proteinlösungen bestätigt. Unter den gewählten Bedingungen wurden keine Proteinbanden erhalten. Am Kopf der Gele war eine mit Coomassie Brilliant Blue färbbare Zone vorhanden, die jedoch auch bei Versuchen mit synthetischem Xanthommatin auftrat.

Gereinigte Granula aus Augen von *Locusta migratoria* wurden ebenfalls mit CTAB-Lösungen extrahiert. Die braun gefärbten Extrakte verhielten sich bei Filtration über Sephadex G 150 und bei Disk-Elektrophorese wie synthetisches Ommidin.

Im ersten Anlauf gelang es somit nicht, ein Ommochrom-Proteid aus den Granula von Calliphora und Locusta in Lösung zu bringen. Versuche in dieser Richtung wurden daher auf einen späteren Zeitpunkt verschoben. Die Proteine, an welche die Ommochrome gebunden sind, sind zweifelsohne in dem farblosen Rückstand zu suchen, welcher nach CTAB-Extraktion der Granula erhalten wird. Gleichzeitig fallen starke Zweifel auf die Ergebnisse von AJAMI und RIDDIFORD (1971), welche zwar behaupten, die Proteinnatur ihrer Ommochrom-Proteide durch zwei Methoden (u.a. durch die Farbreaktion nach LOWRY (1951) charakterisiert zu haben, die aber keine Belege für diese Behauptung vorbringen. Dazu ist anzumerken, daß z.B. sowohl CTAB-Lösungen als auch reine Ommochrome mit dem Folin-Reagens nach LOWRY (1951) positiv reagieren. AJAMI und RIDDIFORD (1971) geben nicht an, ob sie ihr "Proteid" hydrolysiert und die Aminosäuren getrennt und identifiziert haben. In den eigenen Versuchen wurden nach 12-stündiger Hydrolyse des "Ommochrom-Proteids" nur sehr wenige ninhydrinpositive Flecken gefunden.

Die gleiche Kritik gilt auch für die Arbeit von YOSHIDA et al. (1967).

III. Versuche zur Ommochrombiosynthese

1) Xanthommatinbiosynthese in der Entwicklung von Calliphora erythrocephala M.

Xanthommatin wurde aus Calliphora-Augen erstmalig von BUTENANDT und NEUBERT (1955) rein dargestellt. Durch Injektion von ^{14}C -markiertem Tryptophan in Calliphora-Puppen und Nachweis der Radioaktivität im Augenfarbstoff der geschlüpften Fliegen wurde gleichzeitig die Herkunft des Xanthommatins aus dem Tryptophanstoffwechsel bewiesen.

Durch Einbauversuche mit radioaktiv markierten Vorstufen läßt sich auch ein Einblick in den Ablauf der Augenpigmentbildung gewinnen. Solche Versuche sind in zweierlei Hinsicht von Interesse: 1) Es sollte der Zeitpunkt gefunden werden, zu dem die Vorstufe besonders wirksam eingebaut wird. In diesem Stadium ist es besonders aussichtsreich, die Ommochrombiosynthese in vitro zu untersuchen. 2) Es ist bis heute nicht bewiesen, ob es einen Turnover von Ommochromen gibt. Die quantitative Bestimmung des Xanthommatin Gehaltes während der Entwicklung von Calliphora (LINZEN, 1963) zeigt, daß der Pigmentgehalt ab dem 4. Tag nach dem Schlüpfen der Fliegen konstant bleibt (Abb. 18). Von Bedeutung hierbei ist, daß die Synthese anderer Augenpigmente auch nach dem 4. Tag noch anhält: Nach PATAT (1965) nimmt die Menge der Pteridine während der ersten zehn Imaginaltage etwa vier- bis fünffach zu. Es wäre also zu prüfen, ob das konstante Niveau des

Xanthommatins nach dem 4. Imaginaltag auf einem Gleichgewicht zwischen Synthese und Abbau beruht.

a) Reinigung kleiner Mengen (^{14}C)-markierten Xanthommatins

Da im Vergleich zu den Hauptstoffwechselwegen der Stoffwechsel des Tryptophans nur sehr niedrige Umsetzraten zeigt und besonders bei Beginn und am Ende der Farbstoffbildung nur ein sehr schwacher Einbau der radioaktiven Vorstufe zu erwarten ist, mußte zunächst eine Methode zur Reindarstellung kleiner Mengen an Xanthommatin entwickelt werden, mit dem Ziel der Isolierung eines von jeder Fremdkomplexität freien Farbstoffes. Die Methode sollte weiterhin bei einer größeren Zahl von Aufarbeitungen stets vergleichbare und reproduzierbare Ergebnisse liefern können.

Die Abtrennung des Xanthommatins von anderen Ommochromen durch Chromatographie an Perlon- oder Ecteolasäulen wurde von BUTENANDT et al. (1960) beschrieben. Diese Verfahren wurden auf ihre Eignung für die Reinigung kleiner Mengen radioaktiv markierten Xanthommatins geprüft. Chromatographie an Polyamidpulver MN 6-AC und Perlonpulver Ultramid MB 2 K 228 erwiesen sich als ungeeignet. Die nach Papierchromatographie unter UV-Licht erkennbaren Verunreinigungen im Rohextrakt wurden durch keine der beiden chromatographischen Methoden entfernt. Geeignet war dagegen die Chromatographie an Ecteola. Xanthommatin wird am Kopf der Säule nicht, Dihydroxanthommatin dagegen auch aus verdünnter Lösung in einer 1 - 2 mm breiten Zone adsor-

biert. Ohne Verbreiterung der Adsorptionszone kann der Farbstoff mit 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,0, mit 3-proz. Mercaptoäthanol und mit 2, 3 und 5 M NaCl gewaschen werden. Vollständige und rasche Elution des Farbstoffes mit einer Bandenbreite von 1 - 2 cm wird mit 25 ml 3 M Pyridin-Essigsäurepuffer von pH 6,9 (mit Ascorbinsäurezusatz) erreicht.⁺ Geringere Molarität des Elutionsmittels verbreitert die Farbstoffbande. Nach Papierchromatographie im System Kollidin-Phosphat sind im UV-Licht keine Verunreinigungen mehr erkennbar, der Farbstoff wandert in schmaler Zone auf der Salzfront.

In Abb. 11 sind Extinktions- und Aktivitätsverlauf der Fraktionen nach einmaliger Chromatographie des Farbstoffes aufgetragen. In den ersten Fraktionen ist eine radioaktive Verunreinigung vorhanden, die bis zur dritten Fraktion eluiert ist. Da aber Extinktions- und Aktivitätsmaximum des Farbstoffes nicht zusammenfallen, ist der Einbau von Tryptophan-(¹⁴C) nicht eindeutig nachgewiesen.

Wird der Farbstoff rechromatographiert und vor jeder Chromatographie umgefällt, verlaufen Extinktions- und Aktivitätskurven nahezu parallel (Abb. 12). Verunreinigungen sind im Eluat nicht mehr nachweisbar.

⁺ Da die Eigenschaften von Ecteola je nach Fabrikat und Charge verschieden sind, müssen die Elutionsbedingungen gegebenenfalls variiert werden.

Abb. 11

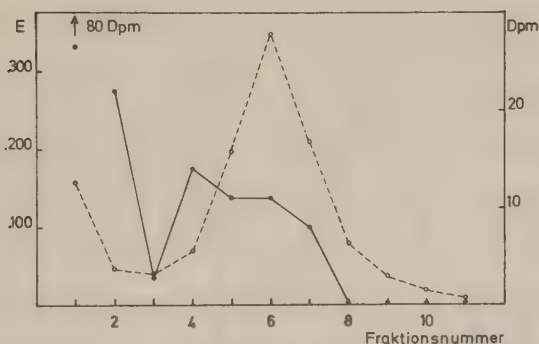


Abb. 11 - 13: Versuche zur Reindarstellung kleiner Mengen ^{14}C -markierten Xanthommatins aus *Calliphora erythrocephala*. Abgebildet ist der Verlauf der Extinktion bei 492 nm (---) und der Radioaktivität (—) in den Fraktionen nach säulenchromatographischer Reinigung unter verschiedenen Bedingungen.

Abb. 11: Einfache Chromatographie (Farbstoff radioaktiv verunreinigt).

Abb. 12: Zweifache Chromatographie, Farbstoff einmal umgefällt (Einbau, keine Verunreinigungen).

Abb. 13: Kontrollversuch: Aufarbeitung inaktiven Xanthommatins und radioaktiven Fremdmaterials.

Abb. 12

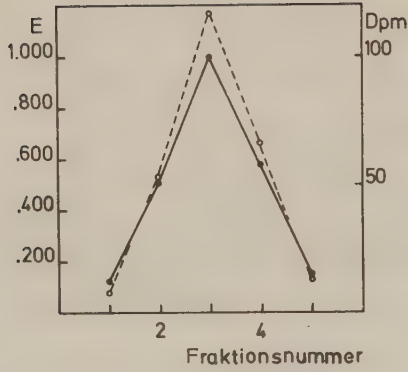
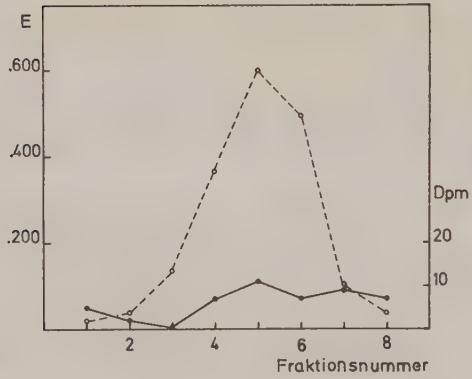


Abb. 13



Um die Abtrennung radioaktiver Verunreinigungen zu prüfen, wurde Xanthommatin aus nicht injizierten Fliegen mit radioaktivem, aber pigmentfreiem Material (Thorax einer injizierten Fliege, ca. 6000 Dpm) gemischt, dann extrahiert und aufgearbeitet. Die Untergrundaktivität betrug in den einzelnen Fraktionen maximal 11 Dpm (Abb. 13). Radioaktive Peaks traten im Bereich des Farbstoffes nicht auf.

b) Der Einbau von Tryptophan-(^{14}C) in Xanthommatin während und nach der Imaginalentwicklung von *Calliphora erythrocephala*

Nach Standardisierung der chromatographischen Reinigung an *Ecteola* wurde der Einbau von Tryptophan-(^{14}C) in Xanthommatin während der Imaginalentwicklung von *Calliphora* und in adulten, geschlechtsreifen Tieren verglichen. Hierzu wurde jeweils vier Tieren eines bestimmten Entwicklungsstages 0,04 μC D,L-Tryptophan-(Ring- ^{14}C) injiziert. Es wurden Tiere vom Beginn der Farbstoffsynthese am 6. Puppentag (50 Proz. der Puppenentwicklungsdauer) bis zum 4. Tag, sowie am 8. Tag nach dem Schlüpfen der Imagines verwendet. Jeweils zwei Tiere wurden gemeinsam aufgearbeitet. Zur Auswertung kamen nur Versuchsergebnisse, bei denen Farbstoffmenge und Radioaktivität in den Fraktionen genau parallel verliefen (vergl. Abb. 12), die radiochemische Reinheit des Farbstoffes also feststand. Die in den einzelnen Farbstoff-Fractionen gemessene Aktivität wurde nach Abzug der graphisch (Verbinden derjenigen Dpm-Werte,

die am Fuß beiderseits des Aktivitätsgipfels liegen) ermittelten Untergrundaktivität summiert, d.h. das Flächenintegral der Aktivitätskurven gebildet und in Abhängigkeit von der Entwicklungszeit aufgetragen (Abb. 14).

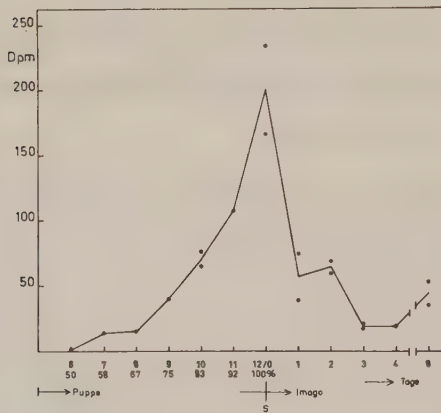


Abb. 14: Einbau von Tryptophan-(^{14}C) in Xanthommatin während und nach der Imaginalentwicklung von *Calliphora erythrocephala*. Die Punkte entsprechen den Flächenintegralen der Aktivitätskurven nach Aufarbeitung von jeweils 2 Tieren. S = Ausschlüpfen

Die erhaltenen Daten zeigen eine langsame Zunahme des Tryptophaneinbaues in Xanthommatin vom 6. bis zum 8. Tag des Puppenstadiums. Nach dem 8. Tag nimmt der Einbau sehr

schnell zu und erreicht zum Zeitpunkt des Schlüpfens ein Maximum. Bis zum 3. Tag des Imaginallebens sinkt er wieder stark ab und bleibt dann auf einem niedrigen Niveau stehen.

Die Ergebnisse werden weiter unten diskutiert werden.

c) Versuche zur Frage des Turnovers von Augenpigment

Der Einbau von Tryptophan- (^{14}C) in Xanthommatin von *Calliphora* ist auch am 8. Tag nach dem Schlüpfen der Fliege noch nachweisbar. Dies ist von Interesse, weil nach dem 4. Tag der Pigmentgehalt im Auge praktisch konstant bleibt (LINZEN, 1963). Die Vermutung ist daher berechtigt, daß der nachgewiesene Einbau der Vorstufe bei konstantem Pigmentgehalt auf einen Turnover des Pigmentes zurückgeht.

Zur Klärung dieser Frage wurden "pulse-chase"-Versuche mit *Calliphora erythrocephala* durchgeführt. Ein Turnover von Xanthommatin könnte durch kurzzeitige radioaktive Markierung des Farbstoffes zum Zeitpunkt einer hohen Syntheserate (z.B. in der frischgeschlüpften Fliege) und Bestimmung der spezifischen Radioaktivität des Augenpigmentes in älteren Tieren nachgewiesen werden. Da die Synthese vom Augenpigment im Verhältnis zu anderen Reaktionen des Stoffwechsels ein sehr langsamer Prozeß ist, wurden als "pulse"-Dauer 24 Std. angesetzt.

Für die Puls-Markierung wurde die unmittelbare Vorstufe des Xanthommatins, 3-Hydroxy-L-kynurenin verwendet, die

mit Tritiumwasser am aromatischen Kern markiert worden war (GRÖGER et al., 1961).

Nach der Tritiierung war das labil gebundene Tritium mit Methanol abgetauscht worden. Bei der chromatographischen Reinigung des Tritiierungsproduktes über Sephadex G 25 wurde als erste Bande (von der Elution des 3-Hydroxy-kynurenins) eine fluoreszierende Substanz erhalten, die spektralphotometrisch von reinem 3-Hydroxy-kynurenin nicht zu unterscheiden war und auch mit gleicher Farbe fluoreszierte. Bei der Papierchromatographie im System BEW lief sie aber fast doppelt so schnell. Da bei der Entfernung des Methanols erwärmt wird, wurde die Bildung eines 3-Hydroxy-kynurenin-methylesters vermutet. Nach Erwärmen dieser Substanz mit Salzsäure wurde papierchromatographisch 3-Hydroxy-kynurenin gefunden. Die Schnellaufende Substanz war dagegen verschwunden. Wurde das labil gebundene Tritium mit Wasser abgetauscht, fand eine Esterbildung nicht statt.

60 6-12 Std. alten Fliegen (aus einem Gelege) wurden je $0,16 \mu\text{C} = 360000 \text{ Dpm}$ an 3-Hydroxy-L-kynurenin-(^3H) injiziert. Ein Drittel der Tiere wurde nach 24 Std. tiefgefroren. Die restlichen Fliegen erhielten vier Tage lang als Trinkwasser eine $1,5 \text{ mM}$ -Lösung unmarkierten 3-Hydroxy-D,L-kynurenins. Dann wurde ein weiteres Drittel der Tiere abgetötet und tiefgefroren. Die restlichen Fliegen erhielten weiterhin Leitungswasser zum Trinken. Sie wurden nach neun weiteren Tagen abgetötet.

Das Xanthommatin der Tiere wurde nach der beschriebenen Methode aufgearbeitet. Jeweils 1 Kopf wurde mit 25 Köpfen unmarkierter Tiere als Trägermaterial versetzt. Die Auswertung des Einbaues erfolgte unter den genannten Kautelen.

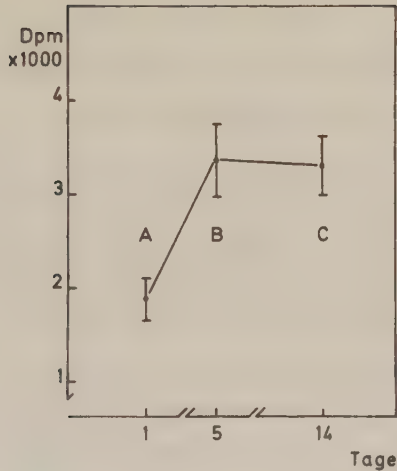


Abb. 15: Versuch zum Turnover von Xanthommatin in den Augen von *Calliphora erythrocephala*: Bestimmung der Radioaktivität in Xanthommatin nach Injektion von 3-Hydroxy-L-kynurenin-(^3H) in frischgeschlüpften Fliegen und Aufarbeitung nach 1 Tag (Gruppe A), 5 Tagen (Gruppe B) und 14 Tagen (Gruppe C). Aufgetragen sind die Mittelwerte und die Standardabweichung der Einbauraten jeder Gruppe.

In Abb. 15 sind die erhaltenen Ergebnisse zusammengefaßt. Gruppe A stellt die Kontrollgruppe dar (24 Std. Einbau), Gruppe B sind die Tiere, die vier Tage lang unmarkiertes 3-Hydroxy-D,L-kynurenin als "chaser" erhielten. Die Werte der Tiere, die weitere neun Tage überlebten, sind in Gruppe C aufgeführt. Nach dem 24-stündigen Einbau nimmt die

Radioaktivität im Augenfarbstoff innerhalb von vier Tagen (Gruppe B) nochmals um 56 Proz. zu (mit $p < 0,0025$ hoch signifikant). Zwischen Gruppe B und Gruppe C ist dagegen kein signifikanter Unterschied ($p < 0,45$).

Um zu prüfen, ob durch das Angebot unmarkierten β -Hydroxy-kynurenins die markierte Substanz verdrängt worden war, wurden die bei -25°C aufbewahrten Fliegenkörper einzeln aufgearbeitet und der Gehalt an β -Hydroxy-L-kynurenin- (^3H) bestimmt. In Vorversuchen hatte sich folgender Aufarbeitungsgang bewährt: Die zerkleinerten Fliegenkörper wurden mit Methanol extrahiert, die Extrakte im Vakuum konzentriert und papierchromatographisch im System BEW aufge-

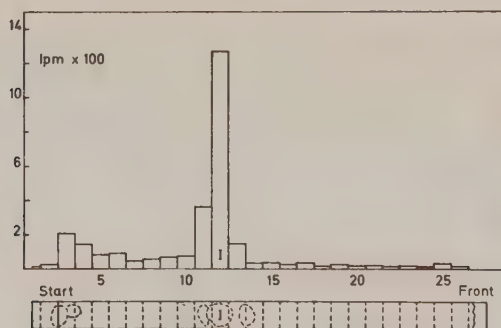


Abb. 16: Reinigung des β -Hydroxy-L-kynurenins- (^3H) aus Methanolextrakten von Fliegenkörpern durch Papierchromatographie im System BEW. Aufgetragen ist die Radioaktivität nach Verbrennung eines in Streifen geschnittenen Chromatogrammes.

trennt, wobei einige Kristalle 3-Hydroxy-kynurenin als Trägersubstanz zugefügt wurden. Der im UV-Licht lokalisierte 3-Hydroxy-kynurenin-Fleck wurde ausgeschnitten und die Radioaktivität nach Verbrennung bestimmt (Abb. 16). Durch diese Methode wird das im Fliegenkörper vorhandene markierte 3-Hydroxy-L-kynurenin quantitativ erfaßt und von radioaktiven Verunreinigungen völlig befreit. Das Ergebnis aller Bestimmungen zeigt Abb. 17. Nach 24 Std.

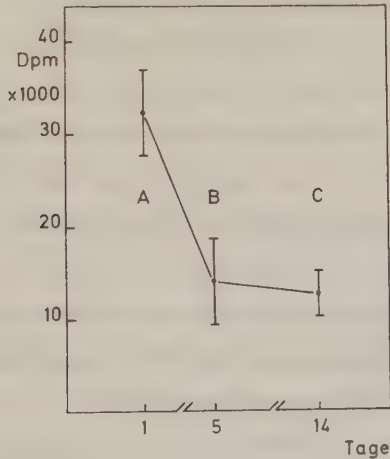


Abb. 17: Gehalt an 3-Hydroxy-L-kynurenin-(^3H) in den Fliegenkörpern der Gruppen A, B und C des Versuches zum Turn-over von Xanthommatin (Abb. 15). Aufgetragen sind die Mittelwerte und Standardabweichung der Bestimmungen von jeder Gruppe.

(Gruppe A) beträgt der Gehalt an 3-Hydroxy-L-kynurenin- (^3H) ca. 32000 Dpm. Er nimmt in den Fliegen während der vier Tage, an denen die nicht aktive Vorstufe im Trinkwasser gereicht wurde, nur um 57 Proz. ab (Gruppe B, mit $p > 0,01$ signifikant). Er nimmt danach fast gar nicht mehr ab (Gruppe C), der geringfügige Unterschied der Mittelwerte ist mit $p < 0,40$ nicht signifikant.

d) Diskussion

Die Ergebnisse des Einbaues von Tryptophan- (^{14}C) in Xanthommatin (Abb. 14) können bei der geringen Anzahl der Meßwerte grobenteils nicht von Tag zu Tag gegeneinander statistisch gesichert werden. Der Kurvenverlauf spricht jedoch für sich. Bestätigt wird er durch den Vergleich mit den Ergebnissen der quantitativen Bestimmung des Xanthommatins in der Imaginalentwicklung von *Calliphora* (LINZEN, 1963; Abb. 18). Zum Vergleich werden die Angaben des Puppenalters in Abb. 18 in Prozent der Puppenentwicklung (PE) umgerechnet (3. Tag = 33 Proz., 4. Tag = 44 Proz., usw., 9. Tag = 100 Proz.).

In beiden Fällen wird ab 55 Proz. der PE Xanthommatin bzw. Tryptophan- (^{14}C)-Einbau erstmalig beobachtet. Pigmentbildung und Einbau der Vorstufe entsprechen während der Imaginalentwicklung einander vollkommen, beide erreichen zum Zeitpunkt des Schlüpfens ein Maximum. Der Pigmentzuwachs ist dann bis zum 3. Tag des Imaginallebens geringer; ebenso geht der Einbau der Vorstufe zurück. Bei den Imagines nimmt der Xanthommatiningehalt noch bis zum 4. Tag zu, danach

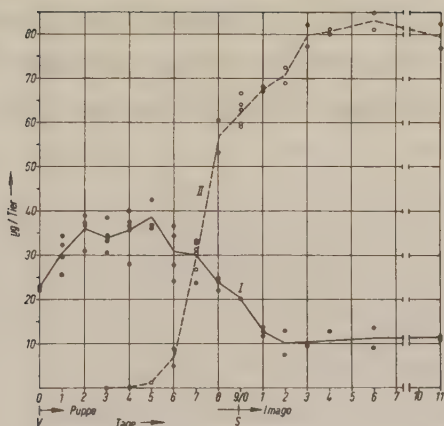


Abb. 18: Gehalt an β -Hydroxy-kynurenin (I) und an Xanthommatin (II) in Puppen und Imagines von *Calliphora erythrocephala*. V = Verpuppung, S = Ausschlüpfen (LINZEN, 1963)

erfolgt keine weitere Zunahme. Der geringfügige Einbau von Tryptophan- (^{14}C) am 8. Tag des Imaginallebens steht aber außer Zweifel ⁺. Für den anhaltenden Einbau der Vorstufe können verschiedene Ursachen in Frage kommen. Eine der Ursachen bestünde darin, daß die Injektion des Tryptophans die Synthese des Xanthommatins erneut in Gang bringt. So konnte MUTH (1969) zeigen, daß bei *Ephesia* a die Vorstufen Kynurenin oder β -Hydroxy-kynurenin die Ommochrombiosynthese in der Puppe zu induzieren vermögen. In den eigenen Versuchen betrug die injizierte Tryptophanmenge aber nur

⁺ er wurde durch weitere Versuche im Rahmen eines Praktikums mehrmals bestätigt

0,16 µg/Tier, von denen ein Großteil in den ersten 2 Std. für die Proteinbiosynthese verbraucht wird (SCHARTAU, 1970). Die Belastung des Tryptophanpools (2,1 µg freies Tryptophan/Tier: LINZEN und SCHARTAU, im Druck) beträgt also unter 8 Proz.

Eine andere Ursache für den anhaltenden Einbau von Tryptophan-(¹⁴C) in das Augenpigment beim älteren Tier wäre ein Turnover. Ein Hinweis dafür findet sich bei WACHMANN (1969). Er fand elektronenmikroskopisch in den Retinulazellen der Sumpfgrippe *Pteronemobius heydeni* autophagische Vakuolen, die unter anderem auch Pigmentgranula einschlossen. Auf *Calliphora* übertragen könnte ein Turnover darin bestehen, daß auch in den älteren Imagines noch Pigmentgranula entstehen, während andere wieder abgebaut werden. Der sehr geringe Einbau der Vorstufe würde demnach durch die Entstehung neuer Pigmentgranula erklärt.

Zur Klärung dieses Problems sollte eine Pulsmarkierung des Augenpigmentes von *Calliphora* beitragen. Eine signifikante Abnahme der Radioaktivität im Augenfarbstoff beim älteren Tier wurde jedoch nicht gefunden (Abb. 15). Überraschend ist im Gegenteil die signifikante Zunahme der Aktivität in den Tagen nach Beginn der Verdrängung der markierten Vorstufe durch unmarkierte Substanz. Dies geht darauf zurück, daß die Menge an radioaktiver Vorstufe im Fliegenkörper nur um die Hälfte abnimmt (Abb. 17). Nach HENDRICHS-HERTEL und LINZEN (1969) wird bei *Calliphora*-Larven fast alles 3-Hydroxy-

kynurenin in den Malphigischen Gefäßen gespeichert. Dort könnte auch bei den adulten Tieren vielleicht die markierte Vorstufe nach der Injektion konzentriert und gespeichert werden und würde durch die Konkurrenz der nicht aktiven Vorstufe nicht verdrängt bzw. allenfalls in der spezifischen Aktivität verringert werden. Für die Synthese markierten Augenpigmentes in dem Zeitraum vom 1. bis zum 5. Tag des Imaginallebens bliebe jedenfalls eine ausreichende Menge an markierter Vorstufe vorhanden. Zwischen dem 5. und dem 14. Tag (Abb. 15) wurde ebenfalls keine signifikante Veränderung im Gehalt an markiertem Augenpigment gefunden. Hypothetisch wäre ein geringer Abbau von markiertem Farbstoff und eine gleichzeitige Neusynthese von markiertem Farbstoff denkbar, wenn die markierte Vorstufe in den Malphigischen Gefäßen gespeichert wäre. Mit den vorhandenen Daten kann ein Turnover nicht ausgeschlossen, aber auch nicht bewiesen werden. Vorgeschlagen wurde in einer Diskussion, die Klärung des Problems durch eine Verpflanzung von Augen mit markiertem Augenpigment in nicht radioaktiv markierte Tiere zu suchen. Dies wäre jedoch ein so großer Eingriff, daß jedes Ergebnis auch beliebig interpretiert werden könnte.

2) Versuche zur Ommochrombiosynthese in vitro

Beweise für die strukturgebundene, in spezifischen Granula stattfindende Synthese der Ommochrome sind bisher nur von der Genetik und Entwicklungsphysiologie geliefert worden.

Auch die morphologische Beschreibung spricht dafür, daß Ommochrome in den Granula synthetisiert und nicht nur in sie eingelagert werden. FUGE (1966) beschrieb die Bildung von Xanthommatin in *Drosophila*-Granula anhand elektronenmikroskopischer Bilder. Auch die mikrospektrometrischen Untersuchungen der Granula von *Calliphora* in situ (LANGER, 1967) deuten darauf hin, daß Xanthommatin erst im Granulum gebildet, dann reduziert und an Trägerstrukturen gebunden wird. Der dafür zu fordernde Enzymapparat sollte bei schonender Isolierung der Granula auch noch in vitro funktionsfähig sein. Bei Anwesenheit der radioaktiven Vorstufe (3-Hydroxy-L-kynurenin) des Xanthommatins könnte markierter Farbstoff in den Granula gefunden werden.

Um dies zu prüfen, wurden Granula aus Augen von *Calliphora* nach Abtrennung von Zelltrümmern und Kernen mit 23000 g sedimentiert und in 0,3 M Sucrose (in Phosphatpuffer pH 7,0, 3 Proz. Mercaptoäthanol) resuspendiert. Dazu wurden 200 µl einer 3-Hydroxy-L-kynurenin-(³H)-Lösung (290 µg = 7,6 µC = $16,8 \times 10^6$ Dpm) gegeben und 2 Std. bei 25°C inkubiert. Danach wurde das Inkubationsgemisch in einem Dichtegradienten (1 - 2,2 M Sucrose in 0,2 M-Stufen) mit 275000 g zentrifugiert und der Inhalt des Röhrchens in Fraktionen aufgeteilt. Die in den Fraktionen enthaltenen Granula wurden abzentrifugiert, der Farbstoff in Lösung georacht und Extinktion sowie Aktivität in den Proben gemessen (Abb. 19). Der allergrößte Teil der wiedergefundenen Aktivität (59 Proz.) ist in den obersten Fraktionen, also noch gelöst. Daneben

ist ein Teil des radioaktiven Materials deutlich in den Pigmentgranula aufgenommen worden. Die Aktivität verläuft parallel zum Farbstoff und entspricht der Anordnung der Banden im Gradienten. Es bleibt dabei offen, ob die radioaktive Vorstufe von den Granula nur adsorbiert oder in das Pigment eingebaut worden ist.

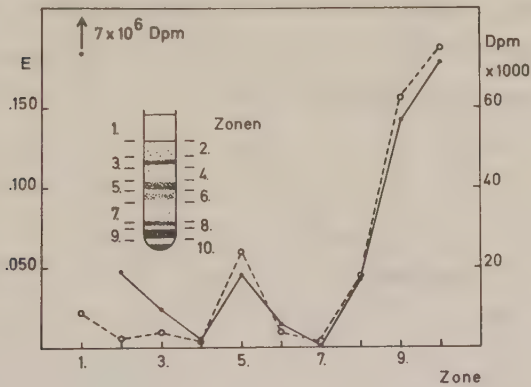


Abb. 19: Einbau von 3-Hydroxy-L-kynurenin-(^3H) in Granula von *Calliphora erythrocephala* in vitro und Auftrennung der Granula im Stufengradienten. Aufgetragen sind Aktivität (—) und Extinktion bei 492 nm (---) der isolierten und in 5-proz. salzsaurem Methanol (SO_2) gelösten Granula aus den Zonen des Gradienten.

Daher wurde versucht, den Farbstoff nach der Inkubation mit der Vorstufe zu isolieren und die eingebaute Aktivität zu messen. Die Reinigung gelang durch wiederholte Chromato-

graphie an Ecteola. Dabei erwies es sich als vorteilhaft, die Granula nach der Inkubation zuerst dreimal im Zentrifugenglas mit je 10 ml 3-proz. Mercaptoäthanol zu waschen, und nach dem Auftragen des gelösten Farbstoffes auf die Säule nochmals mit 16 ml 3-proz. Mercaptoäthanol zu spülen, um die markierte Vorstufe zu entfernen. Vorversuche hatten ergeben, daß radioaktiv markiertes 3-Hydroxy-L-kynurenin beim Auftragen auf die Ecteola-Säule mit der Front des Elutionsmittels wandert (Abb. 20) und nicht mit dem Farbstoff zusammen eluiert wird.

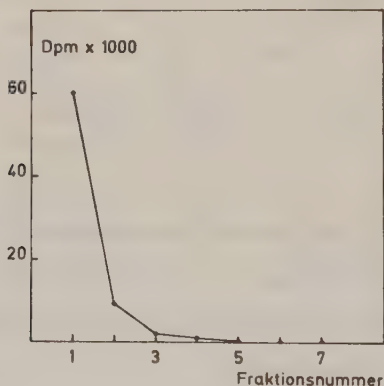


Abb. 20: Chromatographie von 3-Hydroxy-L-kynurenin-(^3H) an Ecteola (Elution mit 4 M Pyridinessigsäurepuffer (Ascorbinsäure) pH 6,9).

Der Hauptversuch mit Granula aus 1/2 Tage alten Fliegen brachte das Ergebnis, daß der Farbstoff einwandfrei markiert war: Extinktion und Aktivität verliefen in den Fraktionen der dritten Chromatographie genau parallel (Abb. 21).

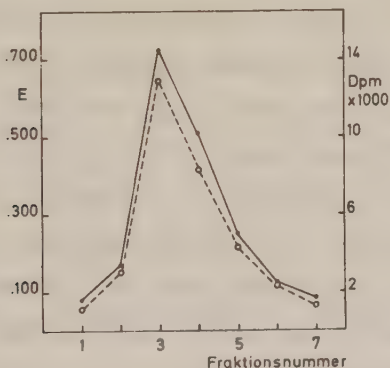


Abb. 21: Einbau von 3-Hydroxy-L-kynurenin-(^3H) in Dihydroxanthommatin mit isolierten Granula von 1/2 Tage alten Fliegen. Aufgetragen sind die Extinktion bei 492 nm (---) und die Radioaktivität (—) in den Fraktionen der dritten Chromatographie des markierten Farbstoffes.

Wenn dieser Nachweis von Radioaktivität im Farbstoff auf eine Synthese von Xanthommatin aus der radioaktiven Vorstufe durch ein in den Granula vorliegendes Enzym zurückgeht, sollte der Einbau in Granula alter Tiere wesentlich

verringert sein. Es wurde daher ein doppelter Kontrollversuch angestellt: 1) Es wurde der Einbau der Vorstufe in isolierte Granula aus 1/2 und 14 Tage alten Fliegen verglichen. Die vorgereinigten Granula aus den Augen von je 30 Fliegen wurden mit je 100 μ l der 3-Hydroxy-L-kynurenin-(^3H)-Lösung 2 Std. bei Zimmertemperatur inkubiert (Versuch A und B). 2) Das aus den Granula von ebenfalls 30 einen halben Tag alten Fliegen isolierte Dihydroxanthomatin wurde unter gleichen Bedingungen inkubiert, um eventuell ein Maß für "Untergrundaktivität" zu erhalten (Versuch C). Die Ansätze wurden parallel aufgearbeitet und der gelöste Farbstoff dreimal an Ecteola-Cellulose chromatographiert. In den Fraktionen nach der dritten Chromatographie wurden Extinktion und Aktivität gemessen (die bei allen Aufarbeitungen parallel verliefen). Die Radioaktivität der Fraktionen einer Farbstoffbande wurde summiert und die spezifische Aktivität (Dpm/Extinkt. Einheit) berechnet.

Die Ergebnisse von je drei derartigen Versuchen zeigt Abb. 22. Gänzlich unerwartet ist das Ergebnis des Versuches C: Bei Inkubation des isolierten Farbstoffes mit 3-Hydroxy-L-kynurenin-(^3H) wurde Tritium in den Farbstoff eingebaut. Dieser zeigte sogar eine um 22 Proz. bzw. 28 Proz. höhere spezifische Aktivität als der Farbstoff aus den Granula der Versuche A (mit $p < 0,025$ signifikant) und B (mit $p < 0,01$ signifikant). Der Unterschied im Einbau bei

1/2 und 14 Tage alten Granula (Gruppen A und B) ist mit $p < 0,2$ nicht signifikant.

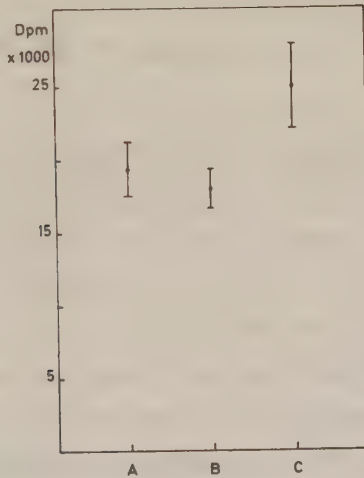


Abb. 22: Einbau von β -Hydroxy-L-kynurenin- (^3H) in Dihydroxanthommatin bei Inkubation der Granula von *Calliphora erythrocephala* in vitro. Versuch A = 1/2 Tage alte Fliegen, Versuch B = 14 Tage alte Fliegen, Versuch C = isolierter Farbstoff. Aufgetragen sind die Mittelwerte sowie Standardabweichung der Einbauraten von je drei Inkubationen.

Die einzige Erklärung ist, daß der Einbau der Vorstufe in den isolierten, gelösten Farbstoff auf Austauschvorgänge während der zweistündigen Inkubation zurückgeht. Ein solcher Austausch scheint sehr rasch vonstatten zu gehen: Wenn

reines Dihydroxanthommatin mit 3-Hydroxy-L-kynurenin-(^3H) vermischt und sofort aufgearbeitet wurde (Zahl der Chromatographien und Waschen des adsorbierten Farbstoffes wie bei den übrigen Experimenten), wurde ebenfalls ein hoher Einbau der markierten Vorstufe gefunden. In zwei Versuchen wurde auch der Ionenaustauscher nach Auftragen des Farbstoffes zunächst mit unmarkiertem 3-Hydroxy-kynurenin (1 mg/ml) gewaschen. Der Austausch des Tritiums muß auf einer Wechselwirkung zwischen Xanthommatin und 3-Hydroxy-kynurenin beruhen. Dabei müßten sich Assoziate zwischen Farbstoff und aromatischem Ring der Vorstufe bilden, in denen die H- bzw. Tritiumatome von einem auf den anderen Ring übergehen können. FUGE (1966) vermutete und diskutierte eine solche Komplexbildung anhand der Spektren von Augenextrakten aus *Drosophila*.

Nach diesem Ergebnis scheint es, daß der beobachtete Einbau der Vorstufe in Granula *in vitro* keine eigene Syntheseleistung der Granula darstellt. Diese Frage muß mit anderweitig markierten Vorstufen neu untersucht werden.

D) Z U S A M M E N F A S S U N G

I. Ommochromgranula aus Augen von *Calliphora erythrocephala*, *Locusta migratoria* und *Gryllus bimaculatus*, sowie aus der Epidermis von *Gryllus* wurden durch Dichtegradienten-Zentrifugation isoliert und ihre Feinstruktur, Größe und Dichte verglichen.

1) Zur quantitativen Beurteilung der Anreicherung dienten zunächst der Quotient aus Farbstoff- und Stickstoffgehalt und die Abnahme des mitochondrialen Leitenzyms Succindehydrogenase. Da diese Kriterien nicht ausreichten, wurden die Granulapräparate auch elektronenmikroskopisch untersucht.

2) Befriedigende Präparationen wurden von Granula aus *Calliphora* nach dreimaliger, bei *Locusta* nach zweimaliger Zentrifugation über einen Dichtegradienten erzielt, hingegen nicht bei *Gryllus*.

3) In isolierten Granula von *Calliphora* (Wildstamm und Mutante w Männchen) treten nach Glutaraldehydfixierung und Stückkontrastierung fibrilläre Feinstrukturen hervor, bei Granula von *Locusta* konzentrische Schichtungen. Im Gegensatz dazu erscheinen Granula von *Gryllus* homogen. Diese Feinstrukturen werden auch bei Granula in situ gefunden.

4) Weder bei *Locusta* noch bei *Gryllus* konnten für die einzelnen Ommochrome spezifische, unterschiedliche Granula nachgewiesen werden. Verschiedene Ommochrome werden bei *Locusta* und *Gryllus* jeweils in gleichen Granula abgelagert. Messungen der Spektren von isolierten Granula zeigten eine bathochrome Verschiebung der langwelligen Absorptionsmaxima von Xanthommatin und Ommidin. Im Gegensatz dazu ist das Ommiminmaximum durch die Bindung an die Granula nicht ver-

schoben. Es gelang bisher nicht, Chromoproteide aus den Granula von *Calliphora* und *Locusta* zu isolieren.

II. Bei *Calliphora erythrocephala* wurden Synthese und Umsatz von Xanthommatin durch Einbau radioaktiv markierter Vorstufen untersucht. Die Chromatographie an einer Ecteola-säule erwies sich für die Reindarstellung kleiner Mengen radioaktiv markierten Xanthommatins als besonders geeignet.

1) Der Einbau von Tryptophan-(^{14}C) in den Farbstoff beginnt am 6. Tag der Puppenentwicklung und erreicht zum Zeitpunkt des Schlüpfens ein Maximum. In älteren Fliegen wird ein geringer, aber signifikanter Einbau nachgewiesen, der auf einen Turnover hinweist.

2) Durch Pulsmarkierung des Augenfarbstoffes zum Zeitpunkt des Schlüpfens und Bestimmung der spezifischen Radioaktivität des Pigmentes in älteren Tieren konnte ein Turnover jedoch nicht bewiesen werden. Eine Bestimmung des im Fliegenkörper verbliebenen 3-Hydroxy-L-kynurenin-(^3H) ergab, daß der Gehalt an markierter Vorstufe nur auf 57 Proz. abgesunken war.

3) Versuche zum Einbau von 3-Hydroxy-L-kynurenin-(^3H) in Xanthommatin in *Calliphora*-Granula in vitro ergaben zwar eine Inkorporation der markierten Vorstufe. Kontrollversuche mit isoliertem Farbstoff führten unter gleichen Bedingungen aber sogar zu einem höheren "Einbau" der Vorstufe. Als Ursache für diesen Effekt wird die Bindung eines Komplexes aus Xanthommatin und 3-Hydroxy-kynurenin und ein H-T-Austausch angenommen.

E) L I T E R A T U R

AJAMI, A.M. and RIDDIFORD, L.M.: Purification and characterization of an ommochrome-protein from the eyes of saturniid moths. *Biochem.* 10, 1455-1460 (1971).

BECKER, E.: Über Eigenschaften, Verbreitung und die genetisch-entwicklungs-physiologische Bedeutung der Pigmente der Ommatin- und Ommingruppe (Ommochrome) bei den Arthropoden. *Z. VererbLehre* 80, 157-204 (1942).

BOWNESS, J.M. and WOLKEN, J.J.: A light-sensitive yellow pigment from the house-fly. *J. gen. Physiol.* 42, 779-792 (1959).

BUTENANDT, A.: Über neue Naturfarbstoffe, ihre Biogenese und physiologische Bedeutung. XVII. Intern. Kongr. reine und angew. Chem. München, 2, 11 (1960).

BUTENANDT, A., BIEKERT, E., KÜBLER, H. und LINZEN, B.: Über Ommochrome, XX. Zur Verbreitung der Ommatine im Tierreich. Neue Methoden zu ihrer Identifizierung und quantitativen Bestimmung. *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* 319, 238-256 (1960).

BUTENANDT, A., BIEKERT, E. und LINZEN, B.: Über Ommochrome, VIII. Isolierung und Charakterisierung von Omminen. *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* 312, 227-236 (1958).

BUTENANDT, A. und NEUBERT, G.: Über Ommochrome, V. Mitteilung: Xanthommatin, ein Augenfarbstoff der Schmeißfliege *Calliphora erythrocephala*. *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* 301, 109-114 (1955).

BUTENANDT, A., SCHIEDT, U. und BIEKERT, E.: Über Ommochrome, III. Mitteilung: Synthese des Xanthommatins. *Liebigs Ann. Chem.* 588, 106-116 (1954).

FUGE, H.: Die Pigmentbildung im Auge von *Drosophila melanogaster* und ihre Beeinflussung durch den *white*⁺- Locus. Z. Zellforsch. 83, 468-507 (1967).

FUZZEAU-BRAESCH, S.: Etude biologique et biochimique de la pigmentation dun insecte *Gryllus bimaculatus* DE GEER (*Gryllide*, *Orthoptère*). Bull. biol. France Belgique 94, 525-627 (1960).

GRASSMÄDER, H.-H.: Untersuchungen über die Ommochromsynthese in Wildform und Mutante c von *Calliphora erythrocephala*. Inaug. Dissertat., Würzburg (1968).

GRÜGER, D., MOTHES, K., SIMON, H., FLOSS, H.G. und WEYGAND, F.: Über den Tryptophan-Stoffwechsel des Mutterkornpilzes. Z. Naturforsch. 16 b, 432-434 (1961).

HANSER, G.: Trägergranula und Ommochrompigmente in den Augen verschiedener Rassen und Transplantat-Träger von *Ephestia künniella* Z. und *Ptychopoda seriata* Schrk. Z. Naturf. 1, 396-399 (1946).

HANSER, G.: Über die Histogenese der Augenpigmentgranula bei verschiedenen Rassen von *Ephestia künniella* Z. und *Ptychopoda seriata* Schrk. Z. VererbLehre 82, 74-97 (1948).

HENDRICH-SHERTEL, U. und LINZEN, B.: Über die Kynurenin-3-Hydroxylase bei *Calliphora erythrocephala*. Z. vergl. Physiol. 64, 411-431 (1969).

HORRIDGE, G.A. und BARNARD, P.B.T.: Movement of palisade in locust retinula cells when illuminated. Quart. J. micr. Sci. 106, 131-135 (1965).

HUNTER-JONES, P.: Rearing and breeding locusts in the laboratory Anti-Locust Research Centre, London (1961).

ISHIGURO, I. und NAGAMURA, Y.: Identification of xanthomatin and isolation of red-protein in the body-fluid of rb-mutant of the silkworm. *Medicine and Biology* 82, 123-126 (1971).

JACOBS, S.: Determination of nitrogen in proteins by means of indanetrione hydrate. *Nature (Lond.)* 138, 262 (1959).

KING, T.E.: Spectrophotometric method with constant level of ferricyanide by recording the decrease of $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3+}$ absorption at 420 nm. In: *Methods in Enzymology* (S.P. Colowick and N.O. Kaplan ed.), X, 322-326. London: Academic Press 1967.

KOLB, G. und AUTRUM, H.: Die Feinstruktur im Auge der Biene bei Hell- und Dunkeladaptation. *J. comp. Physiol.* 77, 113-125 (1972).

KÜHN, A.: Über eine Gen-Wirkkette der Pigmentbildung bei Insekten. *Nachr. Akad. Wiss. Göttingen, Math.-Phys. Kl.* 231-261 (1941).

LANG, C.A.: Simple microdetermination of Kjeldahl nitrogen in biological materials. *Analyt. Chem.* 30, 1692-1694 (1958).

LANGER, H.: Über die Pigmentgranula im Facettenauge von *Calliphora erythrocephala*. *Z. vergl. Physiol.* 55, 354-377 (1967).

LINZEN, B.: Eine spezifische quantitative Bestimmung des 3-Hydroxy-kynurenins. 3-Hydroxy-kynurenin und Xanthommatin in der Imaginalentwicklung von *Calliphora*. *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* 333, 145-148 (1963).

LINZEN, B.: Über Ommochrome, XXIII. Ommidine - ein neuer Typus von Ommochromen aus Orthopteren. *Z. Naturf.* 21 b, 1038-1047 (1966).

LINZEN, B.: Zur Biochemie der Ommochrome. Unterteilung, Vorkommen, Biosynthese und physiologische Zusammenhänge. Naturwissenschaften 54, 259-267 (1967).

LINZEN, B.: Zur Biosynthese von Ommochromen, I. Einbau³⁵S-markierter Vorstufen in Ommine. Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 351, 622-628 (1970).

LINZEN, B.: The tryptophan-ommochrome pathway in insects. Adv. Insect Physiol. 10, im Druck (1974).

LINZEN, B. und SCHARTAU, W.: A quantitative analysis of tryptophan metabolism during development of the blowfly *Phormia Terraenovae*. J. Insect Biochem., im Druck.

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. und RANDALL, R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265 (1951).

MATSUMOTO, J.: Studies on fine structure and cytochemical properties of erythrophores in swordtail, *Xiphophorus Helleri*, with special reference to their pigment granules (pterinosomes). J. Cell Biol. 27, 493-504 (1965).

MUTH, F.W.: Quantitative Untersuchungen zum Pigmentierungs-geschehen in den Augen der Mehlmotte *Ephestia kühniella*. III. Die Pigmentbildung im a-Stamm nach Injektion hoher Dosen von Kynurenin und der Versuch einer Deutung. Wilhelm Roux Arch. EntwMech. Org. 162, 56-77 (1969).

PATAT, U.: Über das Pterinmuster der Facettenaugen von *Calliphora erythrocephala*. Ein Beitrag zur Funktion und Stabilität der Pterine. Z. vergl. Physiol. 51, 103-134 (1965).

RUTHMANN, A.: Methoden der Zellforschung. Stuttgart: W. Keller & Co., 1966.

SCHARTAU, W.: Zur Frage der Verteilung und Verwertung von Tryptophan bei der Schmeißfliege *Phormia regina* und anderen Insekten. Diplomarbeit, München 1970.

SCHÖNINGER, W.: Die Kolbenmethode in der organischen Mikroelementaranalyse. Z. anal. Chem. 181, 28 (1961).

SHOUP, J.R.: The development of pigment granules in the eyes of wild type and mutant *Drosophila Melanogaster*. J. Cell Biol. 29, 223-249 (1966).

STOCKEM, W.: Die Eignung von Pioloform F für die Herstellung elektronenmikroskopischer Trägerfilme. Z. Mikrosk. Forsch. u. Meth. 26, 181-189 (1970).

TATE, P.: A sex-linked and sex-limited white-eyed mutation of the blowfly (*Calliphora erythrocephala*). J. Genet. 48, 176-191 (1947).

WACHMANN, E.: Multivesikuläre und andere Einschlusskörper in den Retinulazellen der Sumpfgrippe *Pteronemobius heydeni*. Z. Zellforsch. 99, 263-276 (1969).

WEBER, K., OSBORN, M.: The reliability of molekulär weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. J. Biol. Chem. 244, 4406-4412 (1969).

WOELLER, F.-H.: Liquid scintillation counting of $^{14}\text{CO}_2$ with phenethylamin. Analyt. Biochem. 2, 508 (1961).

YOSHIDA, M., OHTSUKI, H. and SUGURI, S.: Ommochrome from anthomedusan ocelli and its photoreduction. Photochem. Photobiol. 6, 875-884 (1967).

ZIEGLER, I. und JAENICKE, L.: Zur Wirkungsweise des white-Allels bei *Drosophila melanogaster*. Z. VererbLehre 90, 53-61 (1959).

Legende zu den EM-Bildern:

Abkürzungen: M = Mitochondrium, PG = Pigmentgranulum

EM-Bilder 1 bis 3: Granula aus Augen von *Calliphora erythrocephala* (Wildstamm). 1: Ungereinigte Präparation: Partikel im 180 g-Überstand. 2: Präparation nach Zentrifugation bei 23000 g (SORVALL-Zentrifuge). 3: Durch dreifache Rezentrifugation im Stufengradienten gereinigte Granula. Wegen des amorphen Materials zwischen den Granula vergl. EM-Bild 21.

EM-Bilder 4 und 5: Granula aus Augen von *Locusta migratoria*. 4: Ungereinigte Präparation: Partikel im 180 g-Überstand. Bei den großen, wenig elektronendichten, kontrastlosen Partikeln handelt es sich ebenfalls um Mitochondrien. 5: Durch Rezentrifugation gereinigte Granula.

EM-Bilder 6 und 7: Granula aus Augen von *Gryllus bimaculatus*. 6: Ungereinigte Präparation: Partikel im 180 g-Überstand. 7: Durch einmalige Zentrifugation über einen Sucrose-Stufengradienten angereicherte Granula.

EM-Bilder 8 und 9: Granula aus Epidermisseitenstreifen von *Gryllus bimaculatus*. 8: Ungereinigte Präparation: Partikel im 180 g-Überstand. 9: Durch einmalige Zentrifugation über einen Sucrose-Stufengradienten angereicherte Granula.

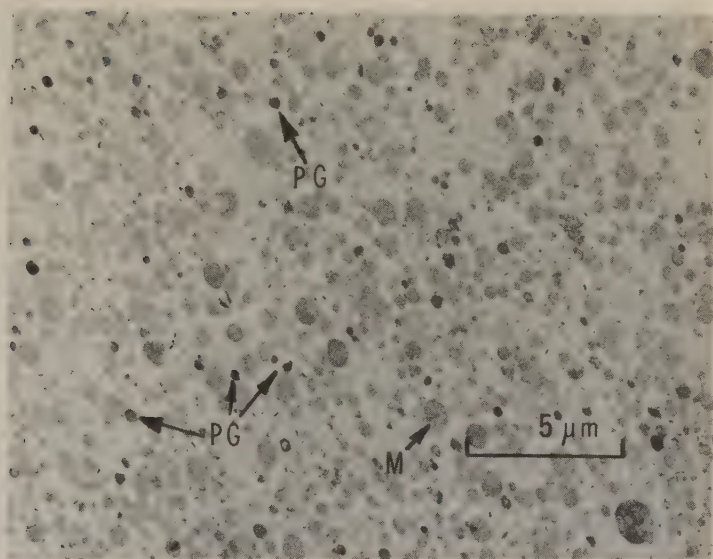
EM-Bilder 10 bis 13: Granula aus Augen von *Calliphora erythrocephala* - verschiedene Fixierungs- und Kontrastie-

rungsmethoden. 10: Fixierung mit Glutaraldehyd und Osmiumsäure. 11: Fixierung mit Glutaraldehyd und Osmiumbichromatlösung, Stückkontrastierung mit Phosphorwolframsäure und Uranylacetat. 12: Fixierung mit Kaliumpermanganat und Stückkontrastierung. 13: Fixierung mit Glutaraldehyd und Stückkontrastierung. Zwischen den Granula amorphes Material, z.T. offensichtlich aus Granula stammend.

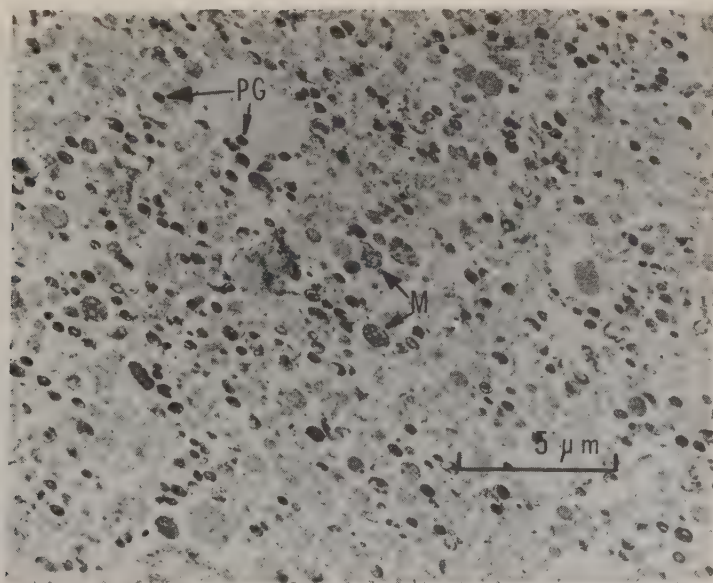
EM-Bilder 14 bis 18: Feinstrukturen von Granula. 14a/b: Isolierte angereicherte Granula aus Augen von Calliphora. 15: Isolierte Granula aus Augen von adulten Locusta. 16: Granula aus Augen des dritten Larvenstadiums. 17: Granula aus Augen von Gryllus; Rohhomogenat. 18: Granula aus den Epidermisseitenstreifen von Gryllus durch einmalige Zentrifugation angereichert.

EM-Bilder 19 und 20a/b: Granula in situ. 19: Granula in Augen von Calliphora; man beachte die gestreckten Risse einzelner Granula. 20a/b: Granula in Augen von Locusta. Man beachte die häufigen konzentrischen Ausbrüche durch das Schneiden.

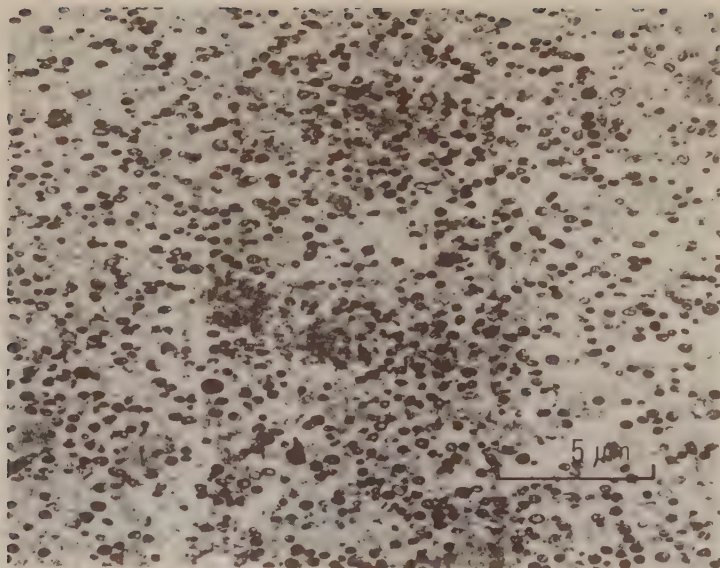
EM-Bild 21: Granula aus Augen der Mutante w Männchen von Calliphora durch einfache Zentrifugation angereichert. Die starke Schädigung der Granula ist auffallend. Das Granulamaterial ist z.T. in amorphen, lockeren Haufen angeordnet.



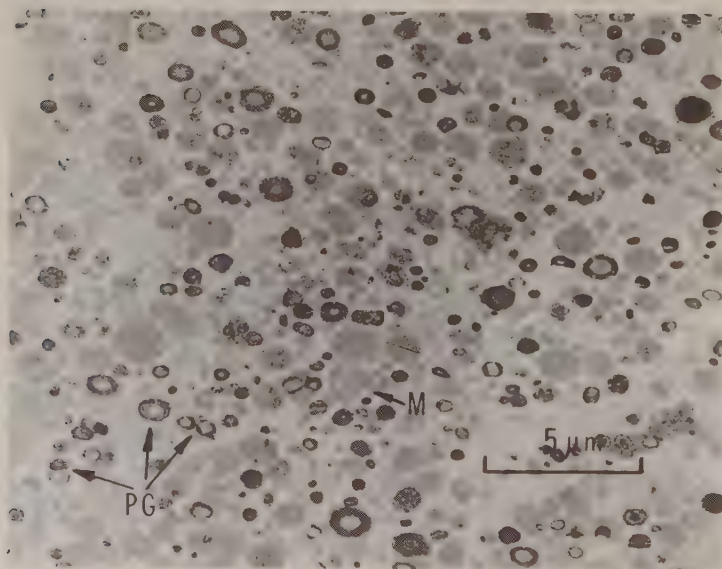
EM-Bild 1



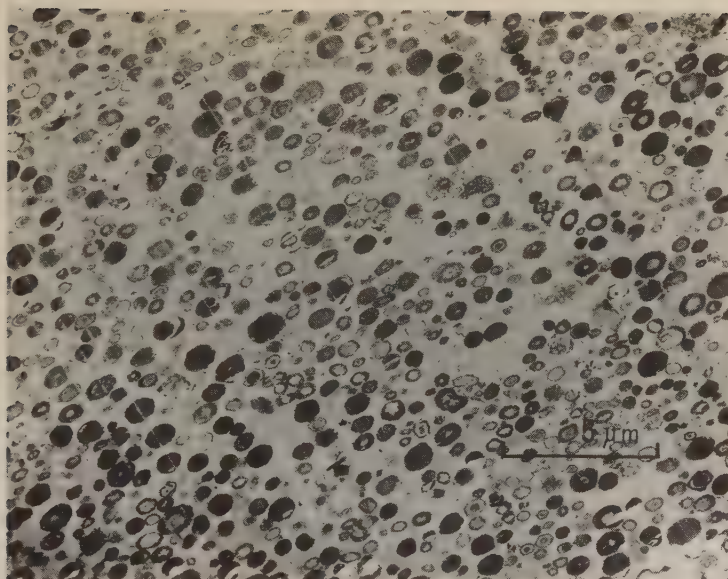
EM-Bild 2



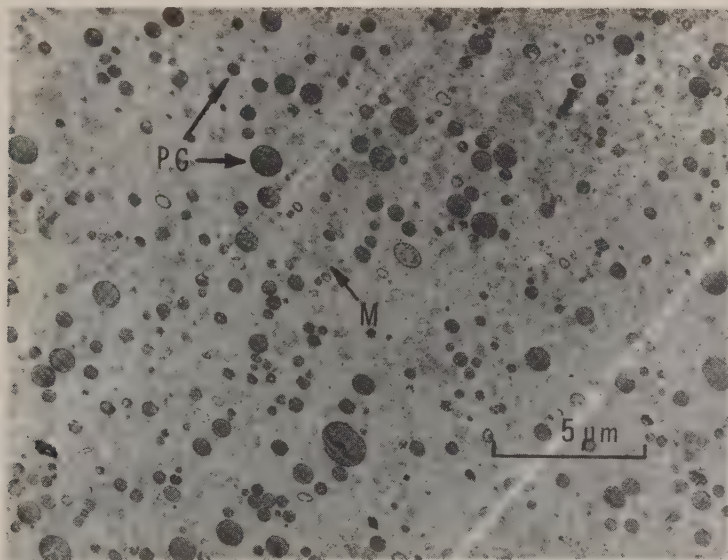
EM-Bild 3



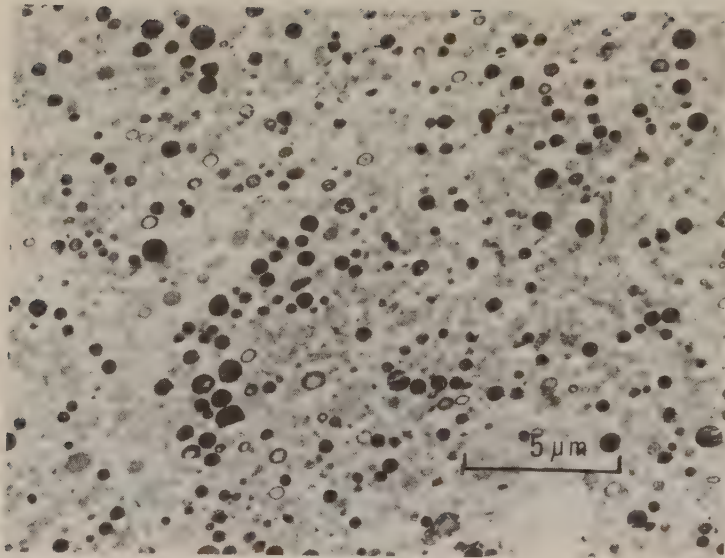
EM-Bild 4



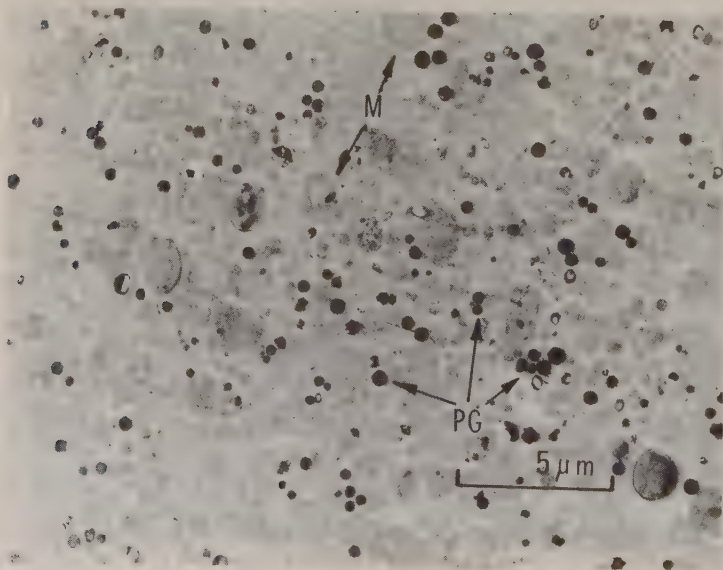
EM-Bild 5



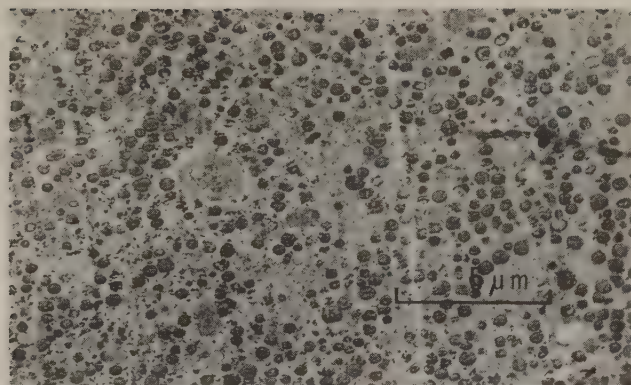
EM-Bild 6



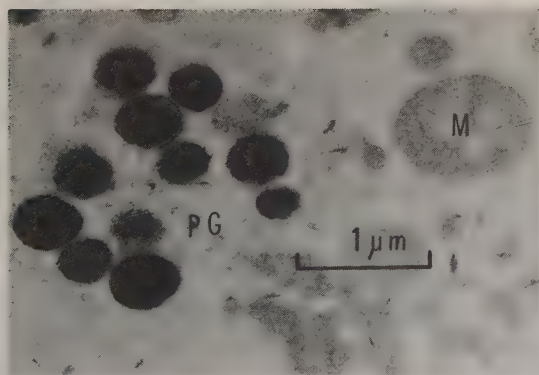
EM-Bild 7



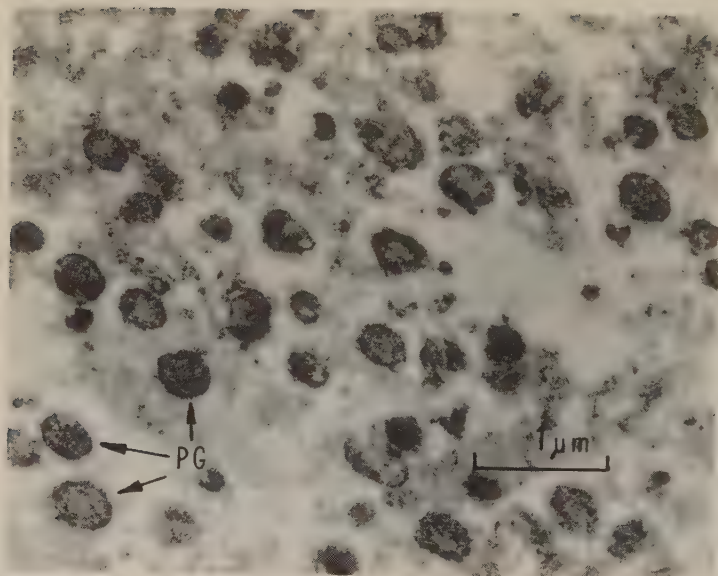
EM-Bild 8



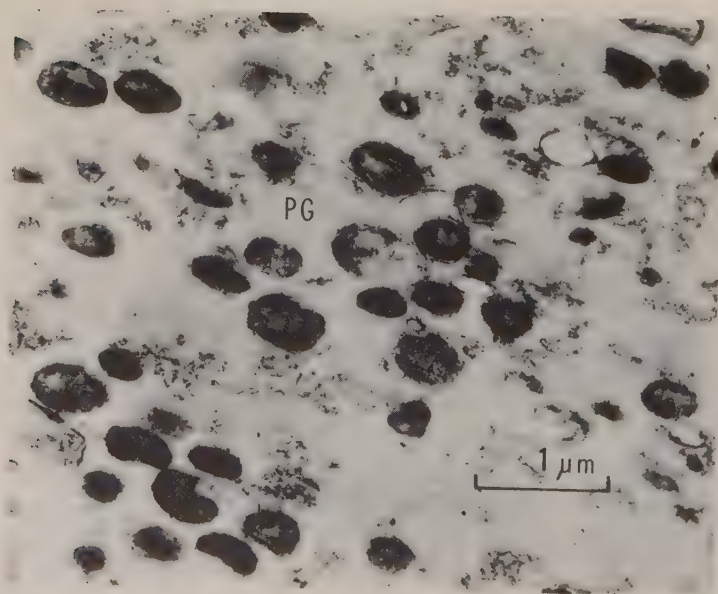
EM-Bild 9



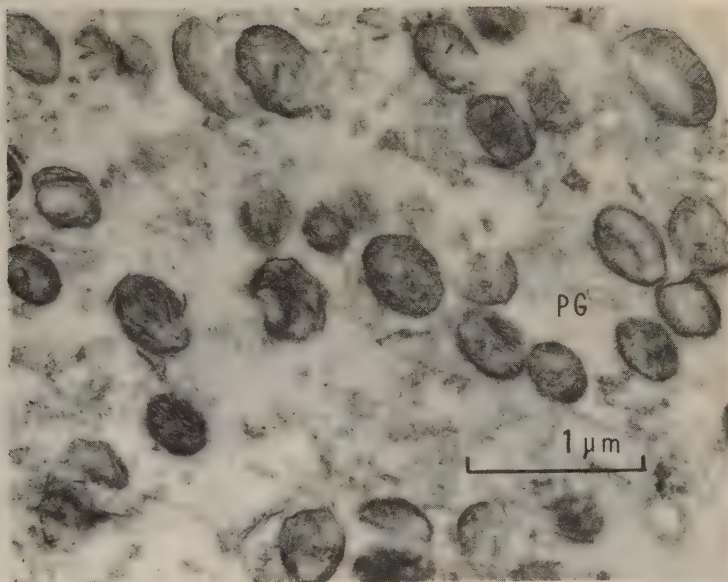
EM-Bild 10



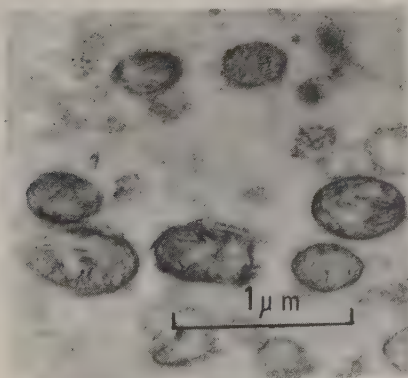
EM-Bild 11



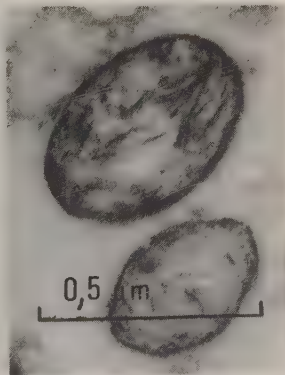
EM-Bild 12



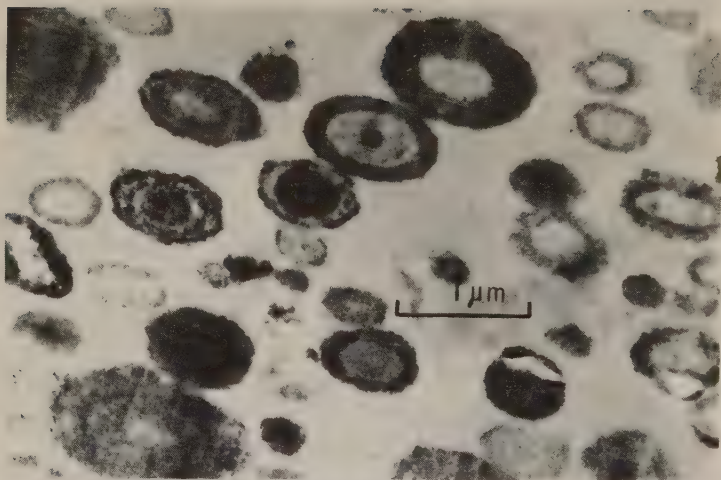
EM-Bild 13



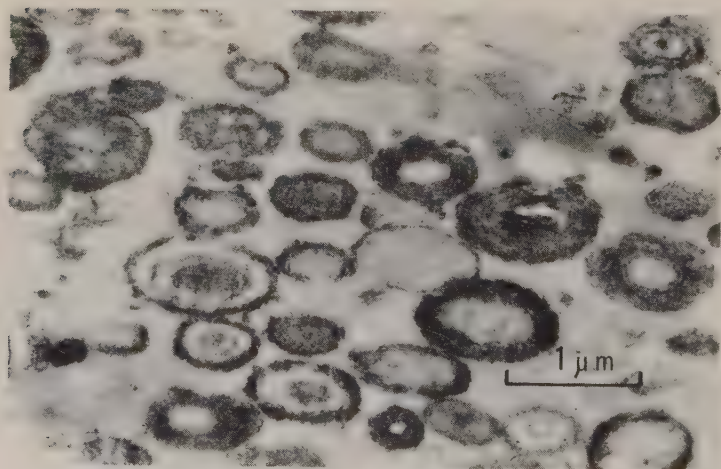
EM-Bild 14a



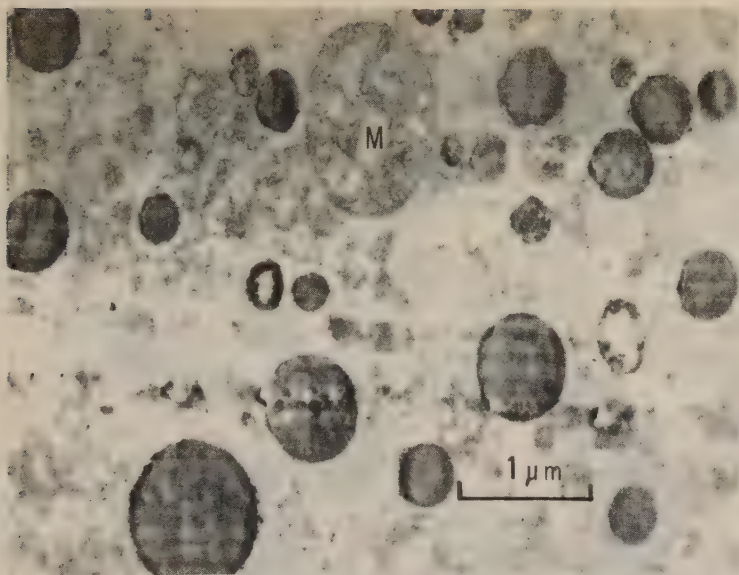
EM-Bild 14b



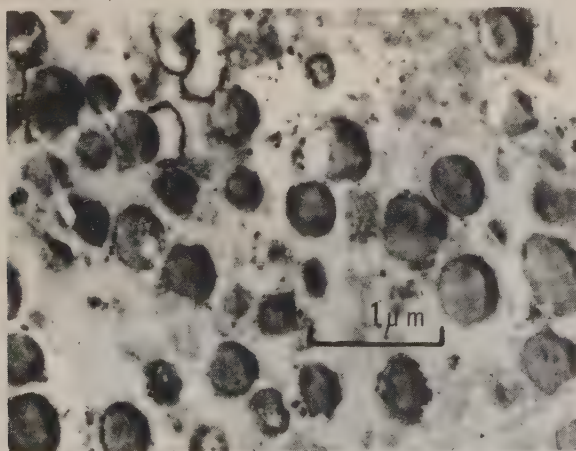
EM-Bild 15



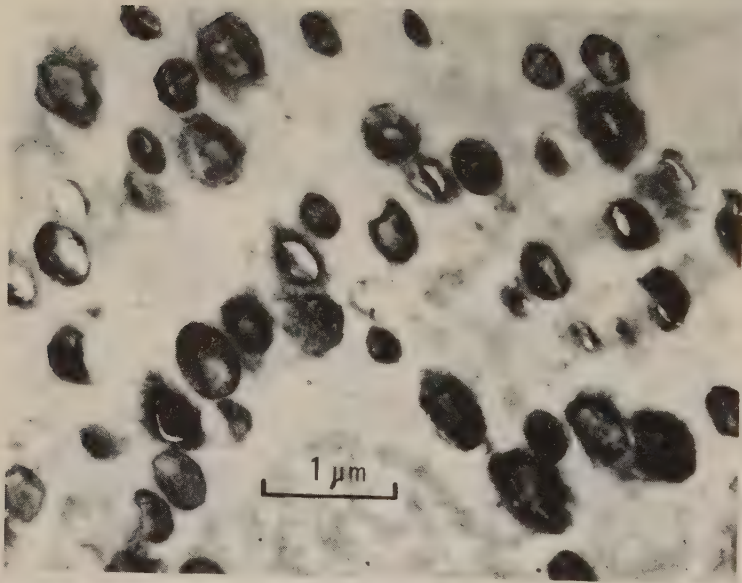
EM-Bild 16



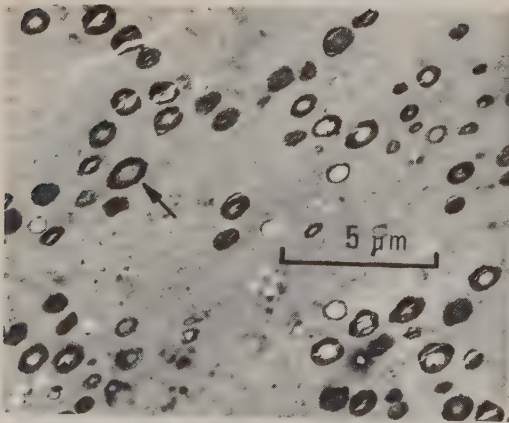
EM-Bild 17



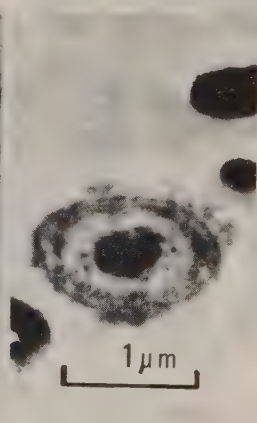
EM-Bild 18



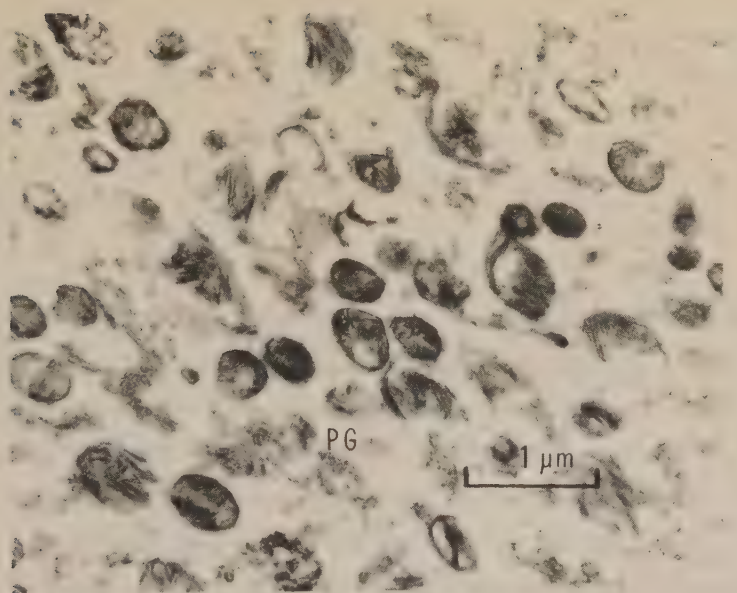
EM-Bild 19



EM-Bild 20a



EM-Bild 20b



EM-Bild 21

LEBENS LAUF

Am 3. August 1943 wurde ich, Hans-Eberhard Hermann Hehl, als erster Sohn des Notariatsinspektors Hermann Hehl und seiner Ehefrau Ruth, geborene Gassel in Traunstein geboren. Ich besuchte dort die Volksschule von 1949 bis 1954, daran anschließend die Oberrealschule bis Juni 1956. Nach dem Umzug meiner Eltern nach München besuchte ich die Oberrealschule in München-Pasing, wo ich im Juli 1963 die Reifeprüfung ablegte. Nach dem Wehrdienst von Oktober 1963 bis September 1965 (1972 Beförderung zum Hauptmann der Reserve) begann ich an der Universität München das Studium der Biologie und Chemie für das Höhere Lehramt an Gymnasien. 1968 heiratete ich. Im Herbst 1970 legte ich das Staatsexamen in den Fächern Chemie und Biologie ab und begann am 1. Februar 1971 mit der vorliegenden Doktorarbeit. Am 4. Februar 1974 begann ich als Studienreferendar den Vorbereitungsdienst am Rupprecht-Gymnasium in München.

